



Rapport 27

Risico inschatting alternatieve huisvesting vleeskuikens

Risk assessment alternative housing systems for broilers



Februari 2007





Colofon

Uitgever

Animal Sciences Group
Postbus 65, 8200 AB Lelystad
Telefoon 0320 - 238238
Fax 0320 - 238050
E-mail info.po.asg@wur.nl
Internet <http://www.asg.wur.nl/po>

Redactie

Communication Services

© Animal Sciences Group

Het is verboden zonder schriftelijke toestemming van de uitgever deze uitgave of delen van deze uitgave te kopiëren, te vermenigvuldigen, digitaal om te zetten of op een andere wijze beschikbaar te stellen.

Aansprakelijkheid

Animal Sciences Group aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade

Abstract

Three series of transmission experiments were carried out to quantify the relative contribution of the outside housing area to the probability of a breakout of Salmonella or Campylobacter in a round. A concept for transmission was developed that was translated into a mathematical model. This model offered an insight into the impact of the probability of transmission from round to round due to the outside area upon the probability of a breakout. For Salmonella, the lower 95% lower confidence limit for transmission was 61%. For Campylobacter the upper 95% confidence limit for transmission was 31%. Intervention strategies should focus on Salmonella survival. A pilot study showed that Salmonella infection in the litter disappeared after coverage with plastic sheets for three weeks.

Keywords: alternative housing broilers risk assessment transmission Salmonella Campylobacter

Referaat

ISSN 1570-8624

A. Lourens, T.J. Hagenars, N. Bolder en B. Er
Risico inschatting alternatieve huisvesting
vleeskuikens (2007)

Rapport 27

40 pagina's, 11 figuren, 10 tabellen

Drie series van transmissie-experimenten werd uitgevoerd waarbij het aandeel van de uitloop i kans op een uitbraak van Salmonella of Campylobacter in een ronde werd bepaald. Een conceptuele beschrijving van de kiemoverdrac werd ontwikkeld en vertaald in een wiskundig model. Dit model geeft inzicht in de impact van transmissie van ronde op ronde als gevolg van uitloop op de kans op een uitbraak. De transmissiekans van ronde op ronde was voor Salmonella minimaal 61% (95% betrouwbaarheidsondergrens) en voor Campylobacter maximaal 31% (95%



Rapport 27

Risico inschatting alternatieve huisvesting vleeskuikens

*Risk assessment alternative housing systems for
broilers*

A. Lourens
T. J. Hagedaars
N. Bolder
B. Engel

Februari 2007

Voorwoord

Alternatieve pluimveehouderijssystemen, zoals biologische systemen en nieuwe ontwerpen als 'Plantage' en 'Rondeel' bieden de dieren meer gedragsmogelijkheden en komen tegemoet aan dierwelzijnswensen uit de maatschappij. Een aantal aspecten van deze systemen, zoals toegang tot een uitloop en verstrekking van strooisel, kunnen echter leiden tot grotere risico's met betrekking tot zoönosen en voedselveiligheid. In 2004 zijn deze risico's en mogelijke oplossingsrichtingen binnen het project 'Welzijn en voedselveiligheid' (programma 414) in kaart gebracht.

Om te inzicht te krijgen in hoeveel groter de risico's zijn in deze alternatieve houderijssystemen, en om in te schatten of mogelijke risicobeheersingstrategieën doeltreffend en/of kosteneffectief zullen zijn, zijn gekwantificeerde risico-inschattingen nodig naar transmissieroutes en overlevingsduur van pathogene kiemen die beïnvloed worden door elementen als strooisel, uitlopen en tijd. De aanwezigheid van een uitloop geeft naar verwachting een belangrijke verhoging van de kans op transmissie van kiemen tussen rondes omdat deze niet zo eenvoudig te reinigen is als de binnenkant van een stal.

Het onderzoek is uitgevoerd in het kader van het programma Zoönosen binnen het cluster voedselkwaliteit, voedselveiligheid en diergezondheid (BO-08-003). In dit onderzoek is samengewerkt tussen de verschillende ASG onderzoeksclusters Veehouderij, Infectieziekten en Kwantitatieve Veterinaire Epidemiologie. De projectgroep bedankt Ineke Eijck voor haar belangrijke rol in de opstartfase van dit project en voor discussies daarna. Ook bedanken we Kitty Maassen voor haar hulp en suggesties ter verbetering van de proefopzet en presentatie van de resultaten. Thomas Hagnaars bedankt Mart de Jong voor waardevolle suggesties. We willen de diervverzorgers op "Het Spelderholt" bedanken voor hun inzet, Frans Putirulan voor het nemen van de monsters, en Elly Katsma voor het kritisch doorlezen van de conceptversie.

De onderzoekers

Samenvatting

Het doel van dit onderzoek was om inzicht te krijgen in de handhavingmechanismen van zoönosen in alternatieve huisvestingssystemen voor vleeskuikens waarbij de kuikens toegang hebben tot een overdekte uitloop. Het onderzoek bestond uit de uitvoering van een aantal transmissie-experimenten en de ontwikkeling van een conceptuele beschrijving van de transmissie tussen opeenvolgende rondes vleeskuikens. Deze conceptuele beschrijving werd vertaald in een wiskundig model, waarmee de transmissiekans van ronde op ronde berekend kon worden. De transmissie experimenten richtten zich op de transmissie van *Salmonella* en *Campylobacter* van ronde op ronde. In de conceptuele beschrijving werden de concepten populatie, omgeving, besmettingsreservoir (in de uitloop) en verval (van de bacterie in de uitloop) opgenomen. Deze beschrijving werd daarna vertaald in een wiskundig model met daarin grootheden als de transmissiekans tussen opeenvolgende rondes (p) en de (her)introductiekans vanuit de omgeving. Met behulp van dit model werd verkend hoe het aandeel van de uitloop in de kans dat een willekeurige ronde besmet raakt met de kiem afhangt van de besmettingskans van buitenaf, van de transmissiekans van ronde op ronde, en van de vervaltijd van de bacterie in de uitloop.

Kuikens werden gehuisvest in een stal waarbij 2 van de 4 hoofdafdelingen toegang hadden tot een uitloop. Iedere hoofdafdeling had 4 met een ijzeren hekwerk afgescheiden subafdelingen. Het betrof hier een overdekte uitloop, waarin een laag strooisel was aangebracht op een betonnen ondergrond. In iedere ronde werden de eendagskuikens op dag 1 in de stal geplaatst, waarna op dag 21 de toegang tot de uitlopen geopend werden; na 35 dagen eindigde een ronde. Er zaten steeds 7 dagen tussen opeenvolgende rondes in een serie. De experimenten vallen uiteen in drie series. De eerste serie bestaat uit twee opeenvolgende rondes (1.1 - 1.2); de tweede serie bestaat uit ook uit 2 opeenvolgende rondes (2.1 - 2.2); de derde serie bestaat uit drie opeenvolgende rondes (3.1 t/m 3.3). Voor de infectie werd een 24-uurs cultuur gebruikt van *Campylobacter jejuni* C356 en een *Salmonella infantis* (nalidixinezuur resistente variant). Deze cultuur werd op het strooisel van de uitloop gesprayed (ronde 1.1) dan wel aangeboden via het drinkwater (rondes 2.1 en 3.1) in een concentratie van 10^5 kve/ml per kuiken.

In de eerste serie werd in ronde 1.1 onderzocht hoe de kuikens de besmetting opnamen en overbrachten in de stal. Tussen rondes 1.1 en 1.2 werden de vier uitlopen van één hoofdafdeling opzettelijk niet schoongemaakt, de uitlopen van de andere hoofdafdeling werden leeggemaakt en opnieuw met schoon strooisel bedekt (interventie). In ronde 1.2 werd het effect van deze interventie getest door het strooisel van de uitloop en de stal regelmatig te bemonsteren. Uitloop en stal werden na afloop van ronde 1.2 grondig gereinigd en ontsmet. Resultaat van deze eerste serie was de kuikens de besmetting niet aantoonbaar mee konden nemen in de stal. Het bleek in deze eerste serie dat de kuikens de besmetting niet aantoonbaar mee konden nemen in de stal. Doordat er maar weinig kuikens gebruik maakten van de uitloop werd besloten deze eerste serie buiten de analyse te houden.

In de tweede serie werden de kuikens in de ronde 2.1 op 7 dagen leeftijd besmet met *Salmonella* en *Campylobacter* via het drinkwater, zodat de kuikens daarna (vanaf 21 dagen leeftijd) de uitloop kunnen besmetten. Op deze manier werd bestudeerd of kuikens de besmetting op konden nemen, om deze besmetting vervolgens naar de uitloop te brengen. De daaropvolgende ronde kuikens 2.2 werd vervolgens blootgesteld aan

deze, niet gereinigde uitloop, om zo de mogelijke overdracht van bacteriën vanuit de uitloop naar de binnenstal te volgen (m.a.w. de mogelijke besmetting van ronde 2.2 via de door ronde 2.1 besmette uitloop). De uitlopen bleken alle effectief besmet onmiddellijk na afloop van ronde 2.1, zowel voor wat betreft Salmonella als Campylobacter. Een ronde later werd Salmonella effectief weer overgebracht naar binnen. Campylobacter werd toen niet meer aangetoond in de uitloop en kon binnen ook niet meer worden aangetoond.

In de derde serie van (ditmaal) drie rondes werd een ongeveer 10 maal zo klein aantal kuikens gebruikt. Omdat ook het oppervlak per subafdeling een factor 10 kleiner werd gemaakt bleef de bezettingsdichtheid gelijk aan die van de eerste en tweede serie. De kuikens werden besmet als in serie twee. Anders dan in de eerste twee series werden er in de derde serie van alle kuikens blindedarmmonsters genomen op dag 35 om de werkelijke besmetting van de kuikens vast te stellen. Deze blindedarmmonsters gaven aan dat er besmette kuikens waren in alle overgebleven subafdelingen. Hieruit bleek dat de mestmonstername een veel beperktere sensitiviteit heeft dan het gebruik van blindedarmmonsters. Op basis van de blindedarmmonsters zijn vrijwel alle afdelingen positief bevonden, terwijl de mestmonsters in slechts enkele gevallen een positieve uitslag gaven, waarbij op verschillende momenten steeds andere afdelingen positief en dan weer negatief waren.

Bij gelijkblijvende kuikendichtheid bleek de transmissiekans niet aantoonbaar afhankelijk van de populatiegrootte. Hierdoor konden de herhalingen voor Salmonella uit series 2 en 3 worden gecombineerd tot een totaal van zes onafhankelijke herhalingen. Voor Salmonella is de puntschatting $p=1$ en de bijbehorende 95%-betrouwbaarheids ondergrens van de transmissiekans $p=0.61$. De resultaten van de experimenten met Salmonella bevestigen tevens de ervaring dat deze bacterie relatief goed overleeft in zelfs een droge omgeving. Een vervalfactor $\gamma=0.9$ (d.w.z. langzaam verval) is indicatief voor Salmonella. Voor Campylobacter is de puntschatting $p=0$ en de bijbehorende 95%-betrouwbaarheids bovengrens van de transmissiekans $p=0.31$. Campylobacter overleeft slecht tussen rondes vleeskuikens in een droge uitloominggeving (snel verval). Een vervalfactor $\gamma=0.1$ is daarom indicatief voor Campylobacter. Met behulp van het wiskundige model kunnen de volgende conclusies worden onderbouwd: Het aandeel van de uitloop, via transmissie tussen rondes, in de kans op besmetting van een ronde neemt af met toenemende kans op besmetting uit de omgeving; Voor grote transmissiekans tussen opvolgende rondes (vgl. Salmonella) is de grootte van dit aandeel slechts zwak gevoelig voor de mate van verval van de bacterie in de uitloop tussen niet-opvolgende rondes; Voor lage transmissiekans tussen rondes en geringe overleving van de bacterie in de uitloop (vgl. Campylobacter onder droge omstandigheden) is het aandeel van de uitloop, via transmissie tussen rondes, in de kans op besmetting van een ronde gering, onafhankelijk van de kans op besmetting uit de omgeving.

De resultaten van dit onderzoek geven aan dat de uitloop een substantiële bijdrage levert aan de handhaving van een Salmonellabesmetting. Gebaseerd op een 95% betrouwbaarheidsinterval, was de kans minstens 61% dat een volgende ronde kuikens deze besmetting opneemt. Omdat voor Salmonella het aandeel van de uitloop, via transmissie tussen rondes, in de kans op besmetting van een ronde zeer substantieel is, is het de moeite waard om te zoeken naar maatregelen om de overleving van Salmonella tussen rondes te verminderen. In besmette mest bleef de besmettingsgraad van Salmonella wekenlang hoog, en kon er zelfs geen afname worden

aangetoond. Een interventietechniek door middel van het afdekken van de mest met plastic zeilen gedurende 3 weken gaf een 100% afname van het aantal kiemen.

Campylobacter kent in de uitloop onder droge omstandigheden een lagere vervalfactor (sneller verval), en voor deze bacterie werd in geen enkele herhaling transmissie van ronde op ronde gevonden (Gebaseerd op een 95% betrouwbaarheidsinterval is de gevonden transmissiekans van ronde op ronde niet groter dan 31%). Het aandeel van de uitloop via transmissie tussen rondes in de kans op besmetting van een ronde is hierdoor veel geringer.

Summary

The aim of this research was to provide insight in the risk of Salmonella and Campylobacter in alternative housing systems for broilers where broilers have access to an outside housing area. A series of transmission experiments were carried out and the conceptual description of the transmission between rounds was developed. This description, featuring concepts such as population, environment, infectivity reservoir (in the outside housing area) and infectivity decay, was used to develop a mathematical model. This model was used to explore how the outside housing area contributes to the probability of infection in a round with Salmonella or Campylobacter, in relation to the probability of infection from the environment (α_e), the transmission probability between successive rounds (p), and the decay of the bacteria in the outside housing area (through a decay factor γ).

Day old hatchlings were housed in a shed that contained four main units; two units had access to the outside housing area. Each main unit was divided into four sub units by metal wired fences. The outside housing area was covered with a roof, and the concrete floor was covered with a layer of wood shavings. In each round, hatchlings were placed at day 1, the outside area was opened at day 21 and each round ended at day 35. A time period of 7 days between two successive rounds was used to clean out and disinfect the shed, and if necessary also to wipe out the outside housing area. The experiment consisted of three series of in total seven rounds. The first series contained two successive rounds (1.1 – 1.2); the second series contained also two successive rounds (2.1 – 2.2); the third series contained three successive rounds (3.1 – 3.3). As infection source, a 24-hrs culture of *Campylobacter jejuni* C356 and *Salmonella infantis* (nalidixine resistant) was used. This culture was sprayed at the woodshavings (round 1.1) or administered orally through the drinking water (rounds 2.1 and 3.1) in a concentration of 10^5 cfu/ml per chick.

In the first series, transmission of Salmonella and Campylobacter from the outside area to the inside of the shed was examined. Between round 1.1 and 1.2, four outside areas of one main unit were deliberately not cleaned, while in the other main unit all four outside areas were cleaned and covered with fresh wood shavings (intervention). In round 1.2 the effect of the intervention was examined by taking manure samples on a regular basis. At the end of round 1.2, both the inside and outside housing area were cleaned. Chicks were not able to transmit a significant infection from the outside area to the inside of the housing area. However, because due to unforeseen reasons only a few chicks had used the outside area, it was decided to exclude the first series from further analysis.

In the second series, in round 2.1 chicks were infected with a culture of Salmonella and Campylobacter in the drinking water at 7 days of age, allowing them to subsequently (from 21 day onwards) infect the outside housing area. The next round of chicks 2.2 was exposed to the, uncleaned, outside housing area, and the subsequent (possible) transfer of infection to the inside housing area was monitored. The outside areas all proved effectively infected with both Salmonella and Campylobacter immediately after round 2.1. In round 2.2, transmission of Salmonella to the inside housing areas was detected. Campylobacter could not be detected anymore, neither in the outside nor in the inside housing areas.

In the three rounds of the third series, a 10 times smaller number of chicks were used than in the first two series. Because the floor surface was decreased proportionally, stocking density remained the same as in series one and two. Chicks were infected as in series two. In series three, different from the first and second series, next to faecal samples, also samples of the appendix of all individual chicks were taken at day 35. This was done to confirm the infection status of individual chicks. Based on appendix samples, all sub units were positive for Salmonella infection whereas based on manure samples only a few subunits were classified as positive and it was observed that, depending on time, different subunits were positive.

At equal stocking densities, no population size dependence of the probability for transmission was found. Therefore, the replications in series two and three were combined to a total of six replications. For Salmonella, the point estimate for transmission between consecutive rounds was $p=1.00$ with a 95% confidence lower limit of $p=0.61$. These results confirm the high survival rate of Salmonella, even in dry environments and therefore, indicative for Salmonella, a value of $\gamma=0.9$ (slow decay) was used in the model calculations. For Campylobacter, the point estimate for transmission was $p=0.00$ with a 95% confidence upper limit of $p=0.31$. These results confirm the low survival rate of Campylobacter in dry environments and therefore, indicative for Campylobacter, a value of $\gamma=0.1$ (fast decay) was used. The mathematical model allows the corroboration of the following conclusions: the contribution of the outside housing area, through transmission between rounds, to the probability of infection of a round is reduced with increasing probability of infection introduction from the environment; For high transmission probability between consecutive rounds (i.e. Salmonella), the magnitude of the contribution is only weakly sensitive to the rate of decay of the bacteria between non-consecutive rounds. For low transmission probability between rounds, a weak survival of the bacteria in the outside housing area (i.e. Campylobacter under dry circumstances), the contribution of the outside housing area (through transmission between rounds) to the probability of infection of a given round is small, independently from the probability of infection introduction from the environment.

It was concluded that the outside housing area in alternative broiler production systems contributes substantially to the maintenance of a Salmonella infection. Based on 95% confidence limits, the probability of transmission from round to round was estimated to be at least 61% for Salmonella. For Salmonella therefore, the contribution of the outside housing area to the transmission from round to round is high and intervention measures that decrease the infectivity level and increase infectivity decay are of obvious interest. It was shown that in infected manure and litter, the Salmonella survival rate is high for many weeks. However, an intervention technique that covered the infected litter with plastic proved to be effective in killing all Salmonellas after three weeks.

Due to the low survival rate of Campylobacter under dry circumstances, none of the inside housing areas was found positive in the round 2.2. As a result, the contribution of the outside housing area to the transmission of Campylobacter from round to round was found to be quite low. Under dry circumstances there is thus little potential to reduce the probability of infection of a given round with Campylobacter by interventions directed towards reducing the infectivity level or increasing the infectivity decay in the outside housing area.

Inhoudsopgave

Voorwoord

Samenvatting

Summary

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | Inleiding..... | 11 |
| 2 | Materiaal en methoden..... | 12 |
| 2.1 | Conceptuele beschrijving van het systeem | 12 |
| 2.2 | Conceptuele beschrijving: transmissie tussen rondes | 13 |
| 2.3 | Conceptuele beschrijving: transmissie tussen vleeskuikens binnen één ronde | 15 |
| 2.4 | Opzet van de experimenten | 16 |
| 2.5 | Diermateriaal en verzorging | 19 |
| 2.6 | Monsternamen en bacteriologische analyses..... | 20 |
| 3 | Resultaten..... | 22 |
| 3.1 | Transmissiekans van Salmonella van Campylobacter van ronde op ronde..... | 22 |
| 3.2 | Modelberekeningen..... | 29 |
| 3.3 | Statistische analyse van de experimentele observaties | 32 |
| 3.4 | Het aandeel van de uitloop in de totale transmissiekans..... | 34 |
| 3.5 | Interventiestrategie getest | 36 |
| 4 | Conclusies | 38 |
| | Literatuur | 40 |
| | Bijlage | 41 |

1 Inleiding

Doel van het onderzoek

Dit onderzoek is gericht op het evalueren van de transmissie van zoönosen tussen rondes vleeskuikens waarbij kuikens de mogelijkheid hebben om gebruik te maken van een uitloop. Het doel van dit onderzoek is om inzicht te krijgen in de handhavingmechanismen (en daarmee ook in de mogelijke risicobeheersingstrategieën) van zoönosen in huisvestingssystemen met strooisel en uitlopen. Daartoe bestuderen we de transmissie tussen rondes van zowel een Salmonella als een Campylobacter stam in een stal met betonnen uitloop met strooisel. Centraal in het onderzoek staat daarom de vraagstelling: “Wat levert de uitloop aan extra risico op voor het optreden van Salmonella en Campylobacter in de vleeskuikenpopulatie in de stal?”.

Aanpak

Het onderzoek bestaat uit de uitvoering van een aantal transmissie-experimenten en de ontwikkeling van een conceptuele beschrijving van de transmissie tussen opvolgende rondes vleeskuikens. Deze conceptuele beschrijving wordt tevens vertaald in een wiskundig model, zodat berekeningen mogelijk worden. De conceptuele beschrijving en het bijbehorende wiskundige model geven samen een raamwerk voor zowel het ontwerp van de transmissie-experimenten als voor het analyseren en interpreteren van de experimentele resultaten.

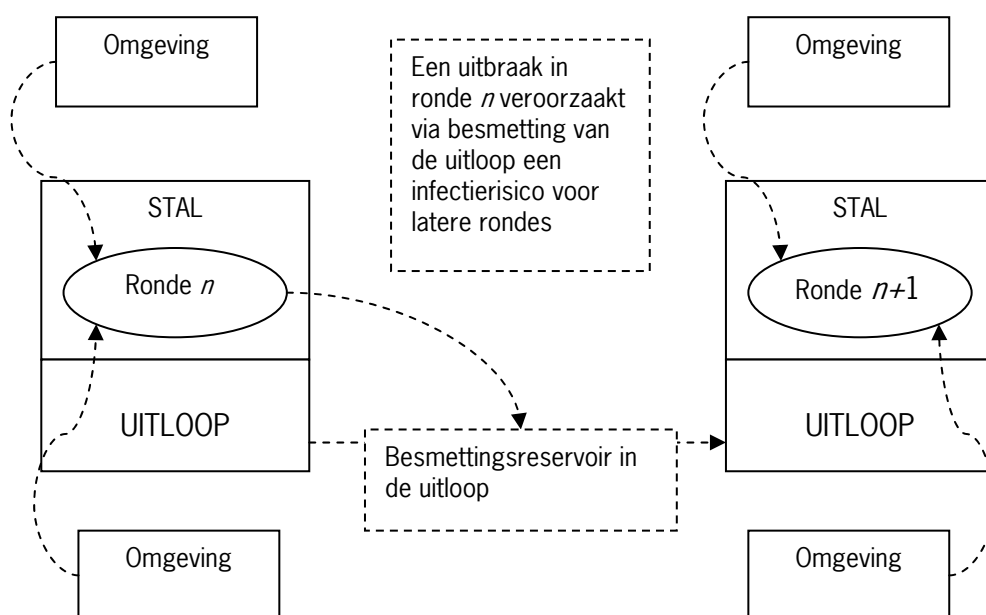
2 Materiaal en methoden

2.1 Conceptuele beschrijving van het systeem

Omdat de conceptuele beschrijving een raamwerk vormt voor onder meer het ontwerp van de uitgevoerde experimenten, wordt deze beschrijving als eerste uitgewerkt. De conceptuele beschrijving is grafisch afgebeeld in Figuur 1. Hier beschouwen we een willekeurige ronde vleeskuikens, gelabeld als ronde n , alsmede de daaropvolgende ronde, gelabeld als ronde $n+1$. Deze beide populaties vleeskuikens zijn hierin aangegeven met een ovaal, en bevinden zich in de stal weergegeven door een rechthoek. Centraal in het diagram is in een gestreepte rechthoek het transmissieconcept weergegeven waar we ons in dit onderzoek op richten: een uitbraak van een kiem in een bepaalde ronde geeft aanleiding tot besmetting van de uitloop (met besmette mest), waardoor latere rondes risico op infectie lopen vanaf het moment dat zij toegang krijgen tot de uitloop. Door middel van de experimenten willen we inzicht willen krijgen in zowel de transmissie tussen rondes, als ook (in een deel van de experimenten) in de verspreiding binnen één ronde. Hierdoor valt de conceptuele beschrijving in twee delen uiteen: één deel beschrijft de transmissie tussen rondes en wordt uitgewerkt in paragraaf 2.2 hieronder, en een ander deel beschrijft de transmissie tussen individuele dieren binnen een ronde en wordt besproken in paragraaf 2.3.

In het bestudeerde houderijsysteem voor vleeskuikens worden in elke ronde 18 kuikens per vierkante meter staloppervlak geplaatst. Na een periode van leegstand van 7 dagen wordt de volgende ronde eendagskuikens in de stal geplaatst. 21 dagen na een nieuwe opzet worden de toegangsluiken naar de uitloop (met een betonnen vloer, waarop houtkrullen als strooisel) geopend en na 35 dagen worden de kuikens geslacht.

Figuur 1. Schematische weergave van een conceptuele beschrijving van de transmissieroutes voor Salmonella and Campylobacter binnen het alternatieve houderijsysteem voor vleeskuikens.



2.2 Conceptuele beschrijving: transmissie tussen rondes

Populatie

De ronde vleeskuikens is de gastheerpopulatie waarin de kiem (Salmonella of Campylobacter) zich vermeerderd en zich van dier tot dier verspreidt. Onder de veronderstelling dat de binnenkant van de stal tussen opvolgende rondes zodanig gereinigd wordt dat de kiem binnen de stal tussen rondes niet kan overleven, kan transmissie van de kiem tussen rondes alleen plaatsvinden via een besmetting van de (niet gereinigde) uitloop. In de conceptuele beschrijving van de kans op transmissie tussen rondes kiezen we ervoor om te werken met de ronde als eenheid van een populatie. Dat betekent dat we in deze beschrijving niet (of niet expliciet) beschrijven hoe *individuele dieren* uit die populatie besmetting oppikken en vervolgens elkaar en de uitloop besmetten.

Echter, een interessant punt bij een beschrijving in termen van rondes is de vraag hoe de (kans op) transmissie tussen rondes afhangt van de grootte (aantal dieren) van die rondes. Om deze vraag te beantwoorden zullen we toch even in termen van individuele dieren moeten denken. Stel dat, bij een gegeven besmettingsgraad per vierkante meter uitloopoppervlak, elk contact met het uitloopoppervlak ('oppikken') van elk individueel kuiken een vaste kans op besmetting van de hele ronde zou geven, dan zou de transmissiekans toenemen met de populatiegrootte (bij gegeven dierdichtheid in de uitloop). Immers hoe meer dieren in een ronde, hoe meer dieren die de uitloop bezoeken, en dus hoe meer contacten met het uitloopoppervlak. In het geval echter dat de besmettingsgraad zodanig hoog is dat de transmissiekans ook voor de kleinste beschouwde populatie dicht bij 100% ligt, zal van zo'n effect van populatiegrootte weinig te merken zijn. Om te onderzoeken of er een merkbaar effect van populatiegrootte is op de transmissiekans tussen rondes zullen we twee transmissie-experimenten uitvoeren met sterk verschillende populatiegroottes.

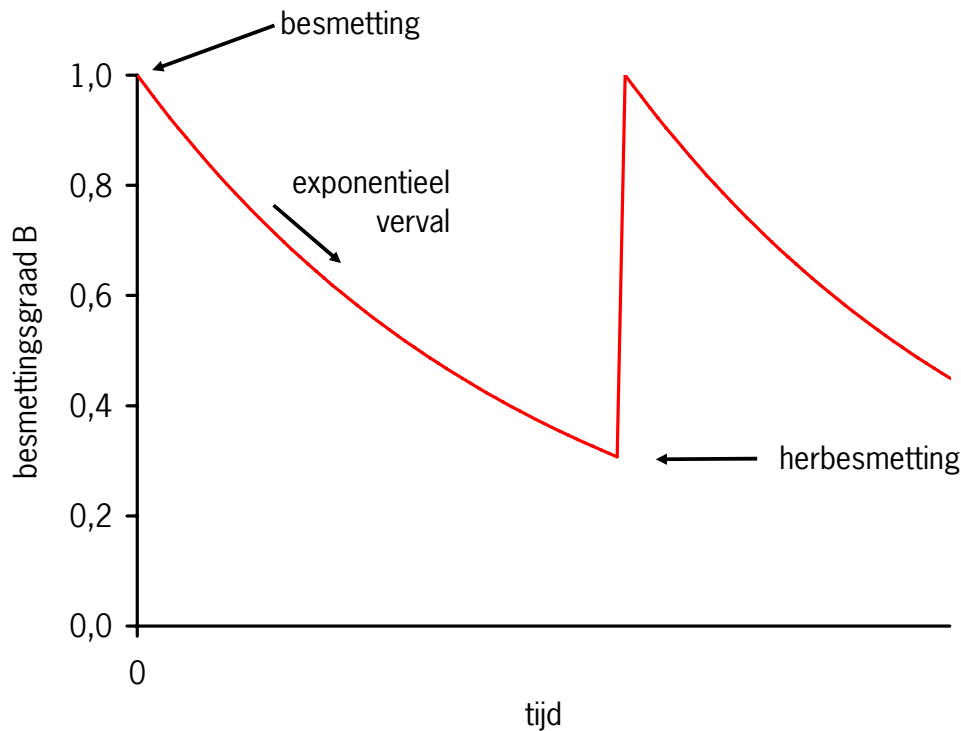
Omgeving

Het concept van 'omgeving' behelst in principe de hele wereld rondom de stal, met uitzondering van de uitloop. Vanuit deze omgeving kunnen infecties worden geïntroduceerd in elke ronde via twee routes, nl. ofwel door het gaas rondom de uitloop, ofwel via een andere route (bijvoorbeeld insleep door plaagdieren of personeel, of door bevolking met reeds besmette eendagskuikens) naar de binnenkant van de stal. In het diagram is de omgeving voor elke ronde twee maal aangegeven om elk van deze twee routes te symboliseren.

Uitloop en besmettingsreservoir

De uitloop vormt een reservoir van besmetting, en we definiëren dit reservoir in onze beschrijving als een reservoir dat alleen vanuit een besmette populatie vleeskuikens kan worden gevuld met besmettelijk materiaal en niet vanuit de omgeving, want de omgeving is al apart opgenomen in de beschrijving. Het idee is verder dat, tenzij er een nieuw materiaal door nieuwe besmette rondes wordt afgegeven, de besmettingsgraad van dit reservoir in de loop van de tijd afneemt door afsterven van de kiem. Een simpel modelconcept hierbij is dat van exponentieel verval, grafisch weergegeven in Figuur 2.

Figuur 2. Grafische weergave van exponentieel verval in de tijd van de besmettingsgraad (B) van een reservoir (uitloop). Bij de pijlen wordt nieuw besmet materiaal aan het reservoir afgegeven.



Wiskundig model

We vertalen de bovenstaande conceptuele beschrijving als volgt in een wiskundig model. Om te beginnen introduceren we de variabele B_n , een getal gedefinieerd als de besmettingsgraad van het uitloopreservoir op het moment dat ronde nummer n toegang krijgt tot de uitloop. We veronderstellen daarbij dat dit getal tussen 0 (geen besmetting) en 1 ("volledige besmetting") ligt. Bovendien veronderstellen we voor de eenvoud dat een besmetting van de populatie in een zekere ronde (zeg nummer n) altijd aanleiding geeft tot het volledige besmet zijn van de uitloop op het moment dat de volgende ronde (nummer $n+1$) toegang krijgt tot de uitloop, met andere woorden $B_{n+1}=1$.

We veronderstellen dat als een zekere ronde n ongeïnfectedeerd blijft, de daaropvolgende ronde $n+1$ bij het betreden van de uitloop blootgesteld wordt aan een door natuurlijk verval verminderde besmettingsgraad $B_{n+1}=\gamma B_n$, waarin de reductiefactor γ een parameter met een (vaste) getalwaarde tussen 0 en 1 is. Dit model komt overeen met exponentieel verval zoals grafisch afgebeeld in Figuur 2, en met een vervaltijd van de kiem in de uitloop die evenredig is met $-1/\log(\gamma)$. Een langzaam verval (lange vervaltijd) komt overeen met een hoge waarde van de vervalfactor γ , en een snel verval met een lage waarde van γ . Vervolgens introduceren we de kans p op transmissie via de uitloop van een besmette ronde naar de opvolgende ronde. Onder besmetting van deze opvolgende ronde verstaan we daarbij dat in deze ronde een uitbraak van de kiem optreedt, met andere woorden dat transmissie tussen en vermeerdering van de kiem in de dieren optreedt, en niet alleen een mechanische insleep van de kiem de stal in. Deze definitie van besmetting is in overeenstemming met de aanname dat een

besmette ronde n aanleiding geeft tot volledige besmetting van de uitloop zoals boven beschreven. We definiëren de kans p_n als de kans voor ronde n op het oplopen van besmetting uit de uitloop. Deze wordt nu gegeven door B_n met p te vermenigvuldigen: $p_n = pB_n$. (Merk op dat inderdaad $p_n = p$ als ronde $n-1$ besmet is geweest, want dan geldt $B_n = 1$).

Zoals genoemd in de conceptuele beschrijving, geeft de “omgeving” aanleiding tot een extern risico op besmetting van rondes. We nemen nu aan dat dit risico wordt gegeven door een constante kans α_e per ronde ($0 \leq \alpha_e \leq 1$). De uitgevoerde experimenten maken een schatting mogelijk van de kans p op transmissie tussen opeenvolgende rondes. De structuur van het voorgestelde transmissiemodel is identiek voor Salmonella en Campylobacter; echter de te schatten parameterwaarden zullen verschillen tussen beide kiemen.

Berekening

Met behulp van het hierboven ontwikkelde wiskundige model kunnen we nu de volgende drie berekeningen gaan uitvoeren:

- Berekening (uit geschatte transmissiekans tussen rondes + gegeven besmettingskans van buitenaf + gegeven overlevingsduur van kiem in uitloop) van de kans dat een willekeurige ronde besmet raakt met de kiem. Deze kans noemen we P^* en is gelijk aan de verwachte fractie van rondes die besmet is.
- Berekening van het aandeel van deze kans dat op het conto van de uitloop te schrijven valt. Dit aandeel noemen we F . F definiëren we als de relatieve bijdrage van het uitloopreservoir aan de besmettingskans P^* :

$$F = \frac{P^* - \alpha_e}{P^*}. \quad (1)$$

- Berekening hoe de kans P^* (als onder 1) en het uitloopaandeel F (als onder 2) afhangen van de besmettingskans van buitenaf (α_e), van de ronde-op-ronde vervalfactor van de kiem (gegeven door γ) in de uitloop, en van de transmissiekans van ronde op ronde (p). Hoe deze berekeningen technisch verlopen, is uitgewerkt in de Bijlage bij dit verslag.

2.3 Conceptuele beschrijving: transmissie tussen vleeskuikens binnen één ronde

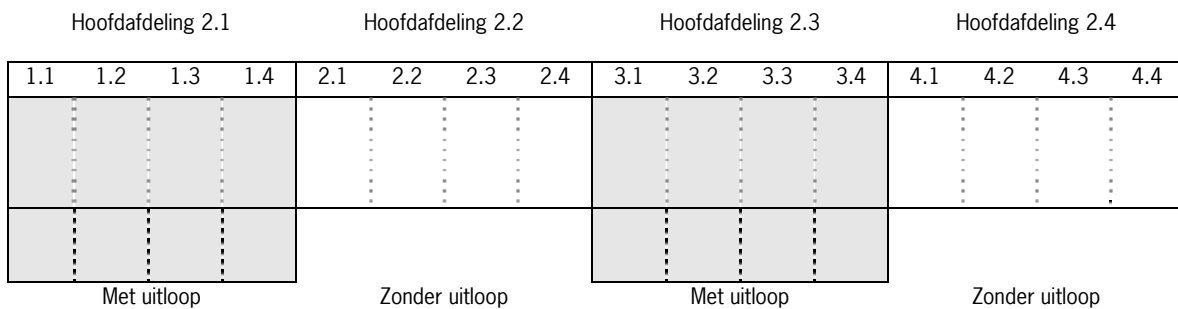
In de conceptuele beschrijving van de transmissie tussen individuele dieren is het vooral van belang om stil te staan bij het onderscheid tussen transmissie tussen dieren onderling en herhaalde insleep van infectie uit een besmette uitloop. Beide processen kunnen, als insleep van Salmonella of Campylobacter uit de uitloop leidt tot een uitbraak binnen een ronde vleeskuikens, bijdragen aan de totale grootte van die uitbraak. Omdat deze twee processen verschillend van aard zijn geven ze aanleiding tot verschillende patronen van variatie (tussen verschillende uitbraken in verschillende rondes) in uitbraakgrootte. Het proces van transmissie tussen dieren onderling is een proces met positieve terugkoppeling, d.w.z. hoe meer dieren geïnfecteerd raken, hoe groter de

infectiedruk voor (nog) niet geïnfecteerde dieren. Dit heeft tot gevolg dat de variatie in het getal x =uitbraakgrootte-1 gekenmerkt wordt door een geometrische verdeling (een vorm van een overgedispergeerde Poisson verdeling met variantie gelijk aan $\mu + \mu^2$, waarbij μ het gemiddelde). Voor een wiskundige afleiding van dit resultaat met behulp van een eenvoudig transmissiemodel verwijzen we naar Renshaw (1991). Het proces van herhaalde insleep heeft geen terugkoppeling: er is een uitloopreservoir met een bepaalde besmettelijkheid, en alle individuele dieren hebben onafhankelijk van elkaar een kans om de besmetting in de uitloop op te pikken. Dit geeft aanleiding tot variatie zoals beschreven kan worden door een binomiale verdeling met overdispersieparameter (McCullagh & Nelder (1989)). In de statistische analyse van gevonden uitbraakgroottes binnen individuele rondes zal dus rekening gehouden moeten worden met het feit dat de uitbraakgroottes voortkomen uit een van deze twee verschillende verdelingsvormen of uit een combinatie van beide. In het laatste geval kan een non-parametrische aanpak (Wilcoxon's signed rank test en Mann-Witney's toets (Conover, 1980)) uitkomst bieden bij statistische analyse.

2.4 Opzet van de experimenten

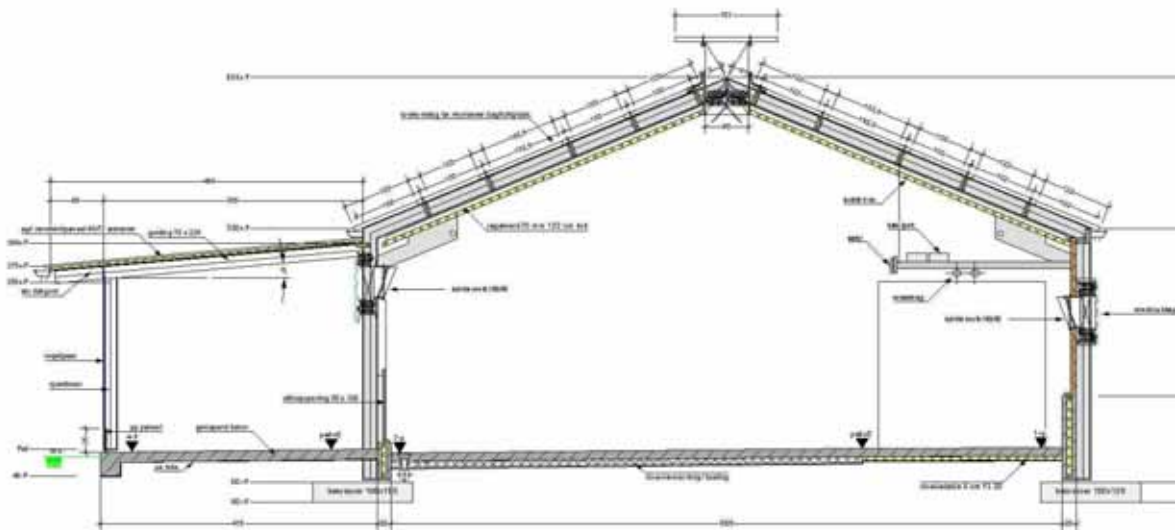
Het experimentele onderzoek werd uitgevoerd in twee hoofdafdelingen (2.1 en 2.3) van stal P2 van Praktijkcentrum Het Spelderholt te Lelystad. Een overzicht van deze stal is weergegeven in figuren 3 en 4. Elke hoofdafdeling was onderverdeeld in vier subafdelingen van 4,3 m breed en 7,3 m diep met een vloeroppervlak van 31,5 m². Deze subafdelingen zijn van elkaar afgescheiden door een hekwerk van metalen schotten van 60 cm hoog, met daarop gaas tot een hoogte van ca. 2 m

Figuur 3. Serie 1: overzicht van stal P2 met 4 subafdelingen per hoofdafdeling. In twee hoofdafdelingen konden de kuikens gebruik maken van een uitloop. In grijs het gebied waar de kuikens konden lopen.



Hoofdafdelingen 2.1 en 2.3 zijn voorzien van een overdekte uitloop van 4,3 meter breed en 4,0 m diep met een vloeroppervlak van 17,2 m². Toegang tot de uitloop wordt verkregen middels twee openingen in de stalmuur (0,69 m breed en maximaal 0,98 m hoog) in elke subafdeling. De bodem van de uitloop bestond uit houtkrullen op een dichte betonnen vloer. Als strooisel werden witte houtkrullen gebruikt (1,5 kg/m²). De overkapping bestond uit zwarte golfplaten. Alle zijwanden van de uitloop waren voorzien van vogelwerend gaas. De uitloop werd in deze proef steeds vanaf een leeftijd van 21 dagen toegankelijk gemaakt.

Figuur 4. Zijaanzicht subafdeling in met uitloop in stal P2



Om gebruikmaking van de uitloop te stimuleren werden beide toegangen tot de uitloop geopend, werden op- en afstapjes (tegels) voor beide openingen aangelegd, en werd er vanaf 14 dagen leeftijd voor de opening gebroken maïs gestrooid (1 kg per subafdeling per dag). Vanaf het moment van openen van de toegangen werd ook gebroken maïs naar buiten gestrooid.



De experimenten vallen uiteen in drie series. De eerste serie bestaat uit twee opeenvolgende rondes (1.1 - 1.2); de tweede serie bestaat uit ook uit 2 opeenvolgende rondes (2.1 - 2.2); de derde serie bestaat uit drie opeenvolgende rondes (3.1 t/m 3.3). In ronde 1.1 werd een dag voor het openen van de uitloop (dag 20) het

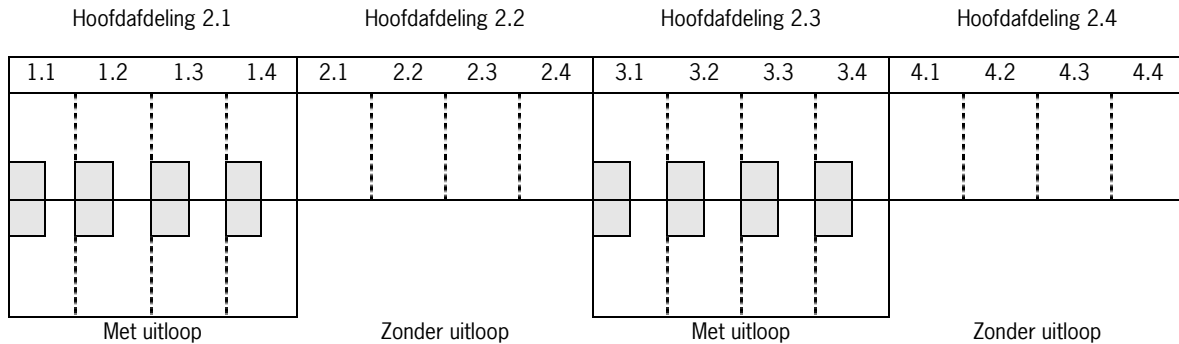
strooisel besmet met een mengcultuur van Salmonella en Campylobacter. Op dag 21 werd de toegang tot de uitlopen geopend, en werd onderzocht hoe de kuikens deze besmetting opnamen en overbrachten in de stal. Tussen ronden 1.1 en 1.2 werden de vier uitlopen van hoofdafdeling 2.1 opzettelijk niet schoongemaakt, de uitlopen van de andere hoofdafdeling 2.3 werd leeggeschept en opnieuw met schoon strooisel bedekt (interventie). In ronde 1.2 werd het effect van deze interventie getest door het strooisel van de uitloop en de stal regelmatig te bemonsteren. Uitloop en stal werden na afloop van ronde 1.2 grondig gereinigd en ontsmet.

De kuikens werden in de ronde 2.1 op 7 dagen leeftijd besmet met Salmonella en Campylobacter via het drinkwater, zodat de kuikens daarna (vanaf 21 dagen leeftijd) de uitloop kunnen besmetten. Op deze manier werd een indruk verkregen of kuikens de besmetting wel op konden nemen, om deze besmetting vervolgens naar buiten te brengen. De uitloop werd ook na afloop van ronde 2.1 regelmatig bemonsterd. In ronde 2.2 werd de situatie nagebootst dat kuikens werden blootgesteld aan een ernstige besmetting van de uitloop, om zo de overdracht van bacteriën vanuit de uitloop naar de binnenstal te monitoren. Wanneer ook de binnenstal in ronde 2.2 vrij zou blijven van Salmonella en Campylobacter, dan levert dat belangrijke aanwijzingen dat niet zozeer de kuikens maar het hygiëmanagement van de binnenstal of wellicht andere vectoren meer verantwoordelijk zijn voor de overdracht van ziektekiemen van ronde op ronde via de uitloop.



In de derde serie (van drie rondes) werden per ronde 10x minder kuikens gebruikt. Doordat ook het oppervlak per subafdeling een factor 10 kleiner werd gemaakt bleef de bezettingsdichtheid gelijk met bezettingsdichtheid van de eerste en tweede serie. In deze derde serie werd bij slacht van alle individuele kuikens een blindedarm (b.d.) monster genomen. Blindedarm monsters geven een veel nauwkeuriger indruk van de mate van besmetting, en geeft uitsluitsel over de vraag of kuikens inwendig besmet zijn en Salmonella daadwerkelijk uitscheiden. Dit in tegenstelling tot het nemen van mestmonsters, omdat daarmee niet het onderscheid gemaakt kan worden tussen daadwerkelijke uitscheiding en het uitwendige transport van de ziektekiemen aan de poten of veren. Deze monsternametechniek is hier praktisch uitvoerbaar omdat het een veel kleiner aantal dieren betreft dan gebruikt in de eerste twee series.

Figuur 5. Serie 2: overzicht van stal P2 met 4 subafdelingen per hoofdafdeling. In twee hoofdafdelingen konden de kuikens gebruik maken van een uitloop. In grijs het gebied waar de kuikens konden lopen.



In de eerste en tweede serie proeven konden de kuikens gebruik maken van de gehele subafdeling inclusief de gehele uitloop (Figuur 2.4). In de derde serie proeven werden er evenveel kuikens per m² opgezet, maar werd er een deel van de stal en de uitloop afgezet met schotten om het effect van een kleinere populatie op de transmissiekans te onderzoeken. Iedere subafdeling zag er vervolgens uit als in Figuur 5. Gedetailleerde gegevens over de bezettingsdichtheid en het gebruikte staloppervlak zijn samengevat in Tabel 2.1.

2.5 Diermateriaal en verzorging

Het onderzoek in de eerste en tweede series experimenten werd uitgevoerd met in totaal 17.920 vleeskuikens; 2.240 kuikens per ronde. Per hoofdafdeling werden 1.120 kuikens geplaatst, dus 560 kuikens per subafdeling. De bezettingsdichtheid was 18 kuikens per m². Kuikens waren van het merk Cobb, en werden bij broederij Lagerweij B.V. in Lunteren gebroed. Het voer voor alle experimenten werd geleverd door De Valk in Wekerom. In de derde serie werd het staloppervlak per subafdeling verminderd met een factor 10. Er werden ook 10x minder kuikens opgezet, waardoor de bezettingsgraad 18 kuikens per m² bleef. Kuikens waren van het merk Ross, en werden deze serie gebroed bij broederij Cobroed & Sloot B.V. in Lievelede.

De kuikens werden geslacht op een leeftijd van 35 dagen. Het voer en water werden gedurende de gehele proefperiode onbeperkt aangeboden. Er werd een 3-fasenvoeding worden toegepast. De volgende fasen werden aangehouden:

- startfase (startvoer: 0-11 dagen),
- groeifase (groeivoer: 12-28 dagen), en
- eindfase (eindvoer zonder coccidiostaticum: 28-35 dagen).

De eerste 2 dagen kregen de kuikens continu licht (24L:0D). Daarna werd in alle afdelingen een lichtschema gehanteerd van 18 uur licht en 6 uur donker (18L:6D). Daarnaast viel er ook daglicht binnen door de uitloopopeningen (continu open). De opvangtemperatuur was 32°C, en werd volgens een standaard programma afgebouwd tot 19°C op dag 21.

Tabel 2.1. Overzicht van de besmettingswijze, merk kuikens, bezettingsdichtheid en staloppervlak in de verschillende rondes.

| Ronde | serie 1 | | serie 2 | | serie 3 | | |
|-----------------------------------|-----------|------|---------|------|---------|------|------|
| | 1.1 | 1.2 | 2.1 | 2.2 | 3.1 | 3.2 | 3.3 |
| Besmetting | strooisel | - | kuikens | - | kuikens | - | - |
| Merk kuikens | Cobb | Cobb | Cobb | Cobb | Ross | Ross | Ross |
| # kuikens/subafdeling | 560 | 560 | 560 | 560 | 56 | 56 | 56 |
| # m ² binnen | 31,5 | 31,5 | 31,5 | 31,5 | 3,2 | 3,2 | 3,2 |
| # m ² uitloop | 17,2 | 17,2 | 17,2 | 17,2 | 1,7 | 1,7 | 1,7 |
| # m ² binnen + uitloop | 48,7 | 48,7 | 48,7 | 48,7 | 4,9 | 4,9 | 4,9 |
| Kuikens binnen/m ² | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 |

2.6 Monsternamen en bacteriologische analyses

Voor de infectie werd een 24-uurs cultuur gebruikt van *Campylobacter* C356 en een *Salmonella infantis* (nalidixinezuur resistente variant). Deze cultuur werd op het strooisel van de uitloop gesprayed (ronde 1.1) dan wel aangeboden via het drinkwater (rondes 2.1 en 3.1). Via het drinkwater werd een mengcultuur toegediend via stulpdrinkers in een concentratie van 10⁵ kve/ml per kuiken. De stulpdrinkers dienden hiervoor geheel leeggedronken te worden. Om alle kuikens te inoculeren, werden de kuikens van 9 tot 11 uur 's ochtends de toegang tot de drinknippelleidingen ontzegd door deze op te takelen.

Frequentie en type van de monsternamen staan vermeld in de resultaat tabellen. Nadat de monsters waren genomen werden ze op het laboratorium onmiddellijk (binnen één uur) in analyse genomen.

- Overschoenmonsters werden voorzien van ca 200 ml Gebufferd Pepton Water (BPW) en vervolgens gehomogeniseerd door met de hand te kneden. Van de vloeistof met mest werd vervolgens de Salmonella en Campylobacter analyse gestart.
- Mestmonsters werden voorzien van een 9-voudige hoeveelheid BPW en gehomogeniseerd. Swabs die werden genomen voor de controle na reinigen en desinfecteren werden voorzien van 5 ml BPW.
- Monsters van de blinde darminhoud werden genomen nadat de intacte blinde darmen uitwendig waren gedesinfecteerd met alcohol. De darmen werden geopend en er werd ca 1 g van de inhoud afgewogen en gehomogeniseerd met een 9-voudige hoeveelheid BPW. Vanuit dit homogenisaat werd een kwantitatieve bepaling ingezet op Briljant Groen Agar met 11 mg/l nalidixinezuur.
- Campylobacter werd bepaald door 0,1 ml van het homogenisaat direct op een CCDA plaat uit te spreiden en 1 ml op te hopen in Preston bouillon. Na incubatie van resp. 48 en 24 uur bij 41,5°C werden de CCDA platen beoordeeld en werd vanuit de Preston een öse op een CCDA plaat geënt. Deze werd vervolgens weer bij 41.5°C geïncubeerd en beoordeeld. De Salmonella analyse werd uitgevoerd volgens het protocol van het Actieplan Salmonella van het PVE (2000).

3 Resultaten

3.1 Transmissiekans van Salmonella van Campylobacter van ronde op ronde

Serie 1

In ronde 1.1 werd een dag voor het openen van de uitloop (dag 20) het strooisel besmet. Op dag 21 werden de uitlopen geopend en konden de dieren naar buiten. De uitloop werd goed besmet met Salmonella (gemiddelde over monsternametijdstippen werd 73% van de uitlopen positief bevonden) maar niet met Campylobacter. Slechts in 1 van de 8 subafdelingen kon binnen op 1 dag na het openen van de uitloop Salmonella worden aangetoond in het strooisel. Omgerekend een besmettingsdruk van slechts 2%. Campylobacter kon zowel buiten als binnen in het strooisel niet worden aangetoond, zie tabel 3.1

Tabel 3.1. Ronde 1.1: aanwezigheid van besmetting (# positief; n=8) gemeten aan de hand van monsterschoentjes onderzoek op Salmonella en Campylobacter binnen in de stal en in de uitloop na infectie van strooisel in de uitloop.

| | 20 | 21 | 24 | 25 | 26 | 27 | 35 | Gemiddeld (%) | Resultaat |
|----------------------|----|----|----|----|----|----|----|---------------|-----------|
| <i>Salmonella</i> | | | | | | | | | |
| - Binnen | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | pos |
| - Uitloop | 0 | 8 | 8 | 6 | 5 | 7 | 7 | 73 | pos |
| <i>Campylobacter</i> | | | | | | | | | |
| - Binnen | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | neg |
| - Uitloop | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | neg |

Opmerkelijk weinig dieren maakten gebruik van de uitloop, waardoor het vermoeden rees dat de kuikens onvoldoende in contact zijn geweest met de kiemen om deze daadwerkelijk op te nemen en uit te scheiden in de stal. Van Campylobacter wordt verwacht dat deze snel afsterft in droog strooisel, dit komt tot uiting in het feit dat er geen enkel monster Campylobacter positief was.

Tabel 3.2. Ronde 1.2: aanwezigheid van besmetting (#positief; n=4) gemeten aan de hand van monsterschoentjes op Salmonella en Campylobacter in de stal en in de uitloop na infectie van strooisel in de uitloop. Uit één uitloop werd het strooisel verwijderd (Interventie: Ja), in de andere uitloop bleef het oude strooisel liggen (Interventie: Nee). Beide uitlopen werden niet opnieuw kunstmatig besmet.

| | | Interventie 20 ^a | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 31 | 35 | Gemiddeld (%) | Resultaat |
|----------------------|-----|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------|-----------|
| <i>Salmonella</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| Stal | Ja | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | neg |
| Stal | Nee | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | neg |
| Uitloop | Ja | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | pos |
| Uitloop | Nee | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 12 | pos |
| <i>Campylobacter</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| Stal | Ja | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | neg |
| Stal | Nee | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | neg |
| Uitloop | Ja | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | neg |
| Uitloop | Nee | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | neg |

^a *Monstername: mestmonsters i.p.v. overschoentjes*

Tussen ronden 1.1 en 1.2 werden de vier uitlopen van hoofdafdeling 2.1 opzettelijk niet schoongemaakt, de uitlopen van de andere hoofdafdeling 2.3 werd leeggemaakt en opnieuw met schoon strooisel bedekt (interventie). In ronde 1.2 kon op dag 20 (1 dag voor het openen van de uitloop) Salmonella worden aangetoond. Op deze dag werden mestmonsters genomen in plaats van overschoentjes. De reden hiervoor was dat de mest zodanig was ingedroogd dat deze niet aan de mestschoentjes bleef plakken en er aldus geen goed monster kon worden genomen. Op dag 3 en dag 7 na het openen van de uitlopen werd Salmonella aangetroffen in de uitloop waar geen interventie plaats heeft gevonden.

In de stal werd binnen in beide hoofdafdelingen geen Salmonella aangetoond, en Campylobacter werd zowel binnen als in de uitloop niet aangetoond. De Salmonella besmetting uit de eerste ronde kon dus in het oude strooisel overleven tot de tweede ronde, maar de besmettingsdruk was niet sterk genoeg om de stal binnen te besmetten via opname en uitscheiding door de kuikens. De interventie nam niet de gehele Salmonelladruk weg, maar heeft de Salmonelladruk zover verminderd dat er met overschoentjes geen Salmonella meer kon worden aangetoond in strooisel of stal.

In ronde 1.1 waren de kuikens moeilijk te bewegen om de uitloop in te gaan; op verschillende momenten waren er op ieder willekeurig moment niet meer dan maximaal 10 – 15 kuikens die gebruik maakten van de uitloop.

Deze kuikens namen de besmetting niet mee naar binnen; alle uitslagen van de binnenruimte waren en bleven negatief. In het strooisel van de uitloop zelf bleef Salmonella aantoonbaar; er kon na 1 dag geen Campylobacter meer worden aangetoond. Tussen ronde 1.1 en 1.2 werd van 1 hoofdafdeling de uitloop leeggeschept en schoongemaakt: hier werd geen Salmonella of Campylobacter meer aangetroffen. In de uitloop die niet werd leeggeschept en niet werd schoongemaakt bleef Salmonella aanwezig in het strooisel (positief in de mestmonsters), maar Salmonella kon daarna niet met overschoentjes worden aangetoond. Ook de binnenafdelingen bleven de hele tweede ronde negatief. In de tweede ronde werd er overigens wel veel gebruik gemaakt van de uitloop: tot 1/3 van de kuikens was buiten te vinden.

Een reden voor het ogenschijnlijk niet optreden van insleep van Salmonella besmetting uit de uitloop zou kunnen zijn dat de mest was ingedroogd en daardoor minder snel werd opgenomen en niet via de poten of het verenpak naar binnen werd versleept. Een andere verklaring hiervoor kan zijn dat de kuikens op drie weken leeftijd al een goede kolonisatie resistentie hebben ontwikkeld, en daarmee in staat zouden zijn sporadisch opgenomen Salmonella snel weer uit te scheiden. Een positief feit is dat Campylobacter transmissie tussen ronden via de besmette uitloop niet waarschijnlijk is. Voor Campylobacter verwachten we dat deze de droogte in het strooisel niet lang genoeg overleeft om een serieuze dreiging te vormen, en zowel het na 1 dag niet meer aantoonbaar zijn van de bacterie in de uitloop als het niet optreden van insleep van Campylobacter besmetting uit de uitloop is consistent hiermee.

Serie 2

Uitloop en stal werden na afloop van ronde 1.2 grondig gereinigd en ontsmet. De kuikens werden in de ronde 2.1 op 7 dagen leeftijd besmet met Salmonella en Campylobacter via het drinkwater, zodat de kuikens daarna (vanaf 21 dagen leeftijd) de uitloop kunnen besmetten. Op deze manier wordt een indruk verkregen of kuikens de besmetting wel op kunnen opnemen, en vervolgens naar buiten kunnen overbrengen. De uitloop werd ook na afloop van ronde 2.1 regelmatig bemonsterd. In ronde 2.2 wordt dan de situatie nagebootst dat kuikens worden blootgesteld aan een ernstige besmetting van de uitloop, om zo de overdracht van bacteriën vanuit de uitloop naar de binnenstal te monitoren. Wanneer ook de binnenstal in ronde 2.2 vrij zou blijven van Salmonella en Campylobacter, dan levert dat belangrijke aanwijzingen dat niet zozeer de kuikens maar het hygiëmanagement van de binnenstal of wellicht andere vectoren meer verantwoordelijk zijn voor de overdracht van ziektekiemen van ronde op ronde via de uitloop.

De uitlopen werden effectief besmet door de kuikens, zowel voor wat betreft Salmonella als Campylobacter (Tabel 3.3). De uitlopen in ronde 2.2 waren 100% met Salmonella op het meettijdstip 3 dagen voordat de uitlopen werden geopend (dag 18), en de kuikens wisten een besmetting over te brengen in gemiddeld 58% van de stallen (Tabel 3.4). In ronde 2.2 werd Campylobacter zowel in de uitlopen als binnen in de stal niet meer waargenomen.

Tabel 3.3. Ronde 2.1: aanwezigheid van besmetting (#positief; n=8) van monsterschoentjes onderzoek op Salmonella en Campylobacter in de stal en in de uitloop na infectie van strooisel in de uitloop door de kuikens. Uitlopen waren allemaal schoongemaakt tussen ronde 1.2 en 2.1; kuikens zijn op 7 dagen leeftijd besmet in de stal via het drinkwater.

| | 8 | 15 | 34 | 35 | Gemiddeld (%) | Resultaat |
|----------------------|---|----|----|----|---------------|------------|
| <i>Salmonella</i> | | | | | | |
| - Stal | 8 | 8 | 7 | 8 | 97 | <i>pos</i> |
| - Uitloop | - | - | 6 | 8 | 88 | <i>pos</i> |
| <i>Campylobacter</i> | | | | | | |
| - Stal | 8 | 8 | 8 | 8 | 100 | <i>pos</i> |
| - Uitloop | - | - | 8 | 8 | 100 | <i>pos</i> |

Tabel 3.4. Ronde 2.2: aanwezigheid van besmetting (#positief; n=8) van monsterschoentjes onderzoek op Salmonella en Campylobacter in de stal en in de uitloop na infectie van strooisel in de uitloop met besmette mest. Uitlopen waren niet schoongemaakt tussen ronde 2.1 en 2.2; in ronde 2.1 waren de kuikens op 7 dagen leeftijd besmet in de stal via het drinkwater.

| | 18 | 25 | 27 | 29 | 33 | 34 | 35 | Gemiddeld (%) | Resultaat |
|----------------------|----|----|----|----|----|----|----|---------------|------------|
| <i>Salmonella</i> | | | | | | | | | |
| - Stal | | 6 | 3 | 5 | 5 | 5 | 4 | 58 | <i>pos</i> |
| - Uitloop | 8 | | | | | | | 100 | <i>pos</i> |
| <i>Campylobacter</i> | | | | | | | | | |
| - Stal | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | <i>neg</i> |
| - Uitloop | 0 | | | | | | | 0 | <i>neg</i> |

Salmonella en Campylobacter vertonen een verschillend beeld wat betreft het voorkomen en overleven in het strooisel. Salmonella kon worden aangetoond in het strooisel, en wanneer het strooisel besmet was via de uitwerpselen van de vleeskuikens waren de kuikens in de volgende ronde in staat deze Salmonella op te nemen en uit te scheiden in de stal. Campylobacter werd in de uitloop snel afgedood en kon derhalve niet aantoonbaar worden overgedragen.

Serie 3

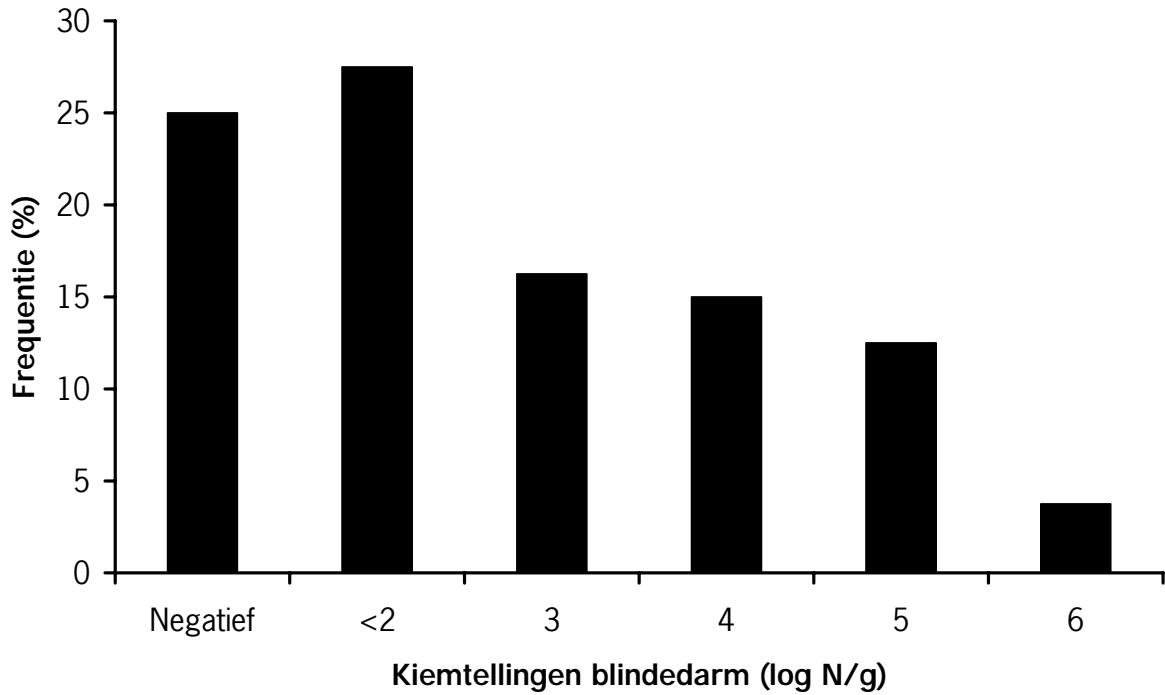
De uitslagen van de monsternames in serie 3 zijn gegeven in Tabel 3.5. Opvallend is dat de mestmonsters 2 dagen na infectie een positieve uitslag geven, en dat op dag 20 slechts in 2 subafdelingen positieve overschoentjes werden waargenomen.

Tabel 3.5. Ronde 3.1: resultaat Salmonellabemonsteringen op 9, 20 en 35 dagen na orale infectie van kuikens via drinkwater op 7 dagen leeftijd.

| | Dag | Methode | afdeling | | | | | | | | |
|------------------------|-----|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 1.4 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | |
| Kuikenpapier | 0 | inlegvel | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Binnen | 9 | mest | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Binnen | 20 | mest | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Uitloop | 20 | mest | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Kuikens bemonsterd (#) | 35 | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Kuikens positief (%) | 35 | b.d. | 100 | 100 | 80 | 90 | 30 | 60 | 80 | 60 | |
| Resultaat | | | pos | pos | pos | pos | pos | pos | pos | pos | pos |

Het feit dat er op dag 35 in alle subafdelingen positieve blindedarmmonsters werden gevonden geeft aan dat de overschoentjes en mestmonsters geen goed beeld geven van de besmettingsdruk. Figuur 6 geeft aan dat ongeveer 25% van alle kuikens geheel vrij waren van besmetting met *Salmonella infantis*, en dat er een grote variatie in het aantal kiemen tussen verschillende kuikens bestaat, uiteenlopend van zeer licht besmet ($\log(N/g) = 2-3$) tot zwaar besmet ($\log(N/g) = 5-6$).

Figuur 6. Kiemtellingen (Log N/g) in blinde darm bij kuikens op 35 dagen leeftijd die zijn geïnfecteerd met *Salmonella infantis* op dag 7.



In ronde 3.2 werden de uitlopen wederom geopend op 21 dagen leeftijd, waarna de kuikens toegang hadden tot de geïnfecteerde uitloop (zie Tabel 3.6).

Tabel 3.6 Ronde 3.2: resultaat Salmonella-bemonsteringen op 0, 7, 14 en 35 dagen. Op dag 21 werd de uitloop geopend. De afdelingen waar binnen op dag 14 positieve mestmonsters werden gevonden zijn geruimd op dag 20, dus voordat de toegang tot de overige uitlopen werd geopend.

| | Dag | Methode | afdeling | | | | | | | |
|------------------------|-----|----------|------------|-----|-----|------------|-----|------------|------------|------------|
| | | | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 1.4 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 |
| Kuikenpapier | 0 | inlegvel | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Binnen | 0 | swabs | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Uitloop | 0 | mest | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Binnen | 7 | mest | - | - | + | - | - | - | - | - |
| Binnen | 14 | mest | - | + | - | - | - | - | - | + |
| Uitloop | 14 | mest | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Binnen | 20 | mest | - | + | - | - | - | - | - | + |
| Kuikens bemonsterd (#) | | | 51 | 54 | 48 | 52 | 47 | 54 | 44 | 53 |
| Kuikens positief (%) | 20 | b.d. | | 98 | 0 | | | | | 55 |
| Kuikens positief (%) | 35 | b.d. | 45 | | | 60 | 53 | 28 | 59 | |
| Resultaat | | | pos | | | pos | | pos | pos | pos |

Ondanks dat in ronde 3.2 de mestmonsters van de uitlopen op dag 0 en 14 een positieve Salmonella uitslag gaven, waren er op dag 14 en 20 slechts 2 subafdelingen waarvan de mestmonsters positief waren (tabel 3.5). Dat waren ook de afdelingen waarvan de blinde darmen op 20 dagen een positieve uitslag gaven. In subafdeling 1.3 waren alle 48 kuikens Salmonella negatief ondanks dat er één Salmonella positief monster werd gevonden op dag 7. De blindedarmmonsters op 35 dagen gaven aan dat er besmette kuikens waren in alle overgebleven subafdelingen.

Tabel 3.7. Ronde 3.3: resultaat Salmonella bemonsteringen op 0, 7, 20, 24 en 35 dagen. Op dag 21 werd de uitloop geopend.

| | Dag | Methode | afdeling | | | | | | | | |
|------------------------|-----|----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | | 1.1 | 1.2 | 1.3 | 1.4 | 2.1 | 2.2 | 2.3 | 2.4 | |
| Kuikenpapier | 0 | inlegvel | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Binnen | 0 | swabs | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Binnen | 7 | mest | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Binnen | 14 | mest | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Binnen | 20 | mest | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Uitloop | 20 | mest | + | - | - | + | - | + | + | + | + |
| Binnen | 24 | mest | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Uitloop | 24 | mest | + | - | + | - | + | + | - | + | + |
| Binnen | 35 | mest | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Uitloop | 35 | mest | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Kuikens bemonsterd (#) | | | 54 | 48 | 48 | 49 | 54 | 51 | 53 | 53 | |
| Kuikens positief (%) | 35 | b.d. | 39 | 23 | 73 | 84 | 2 | 4 | 9 | 81 | |
| Resultaat | | | pos | pos | pos | pos | pos | pos | pos | pos | pos |

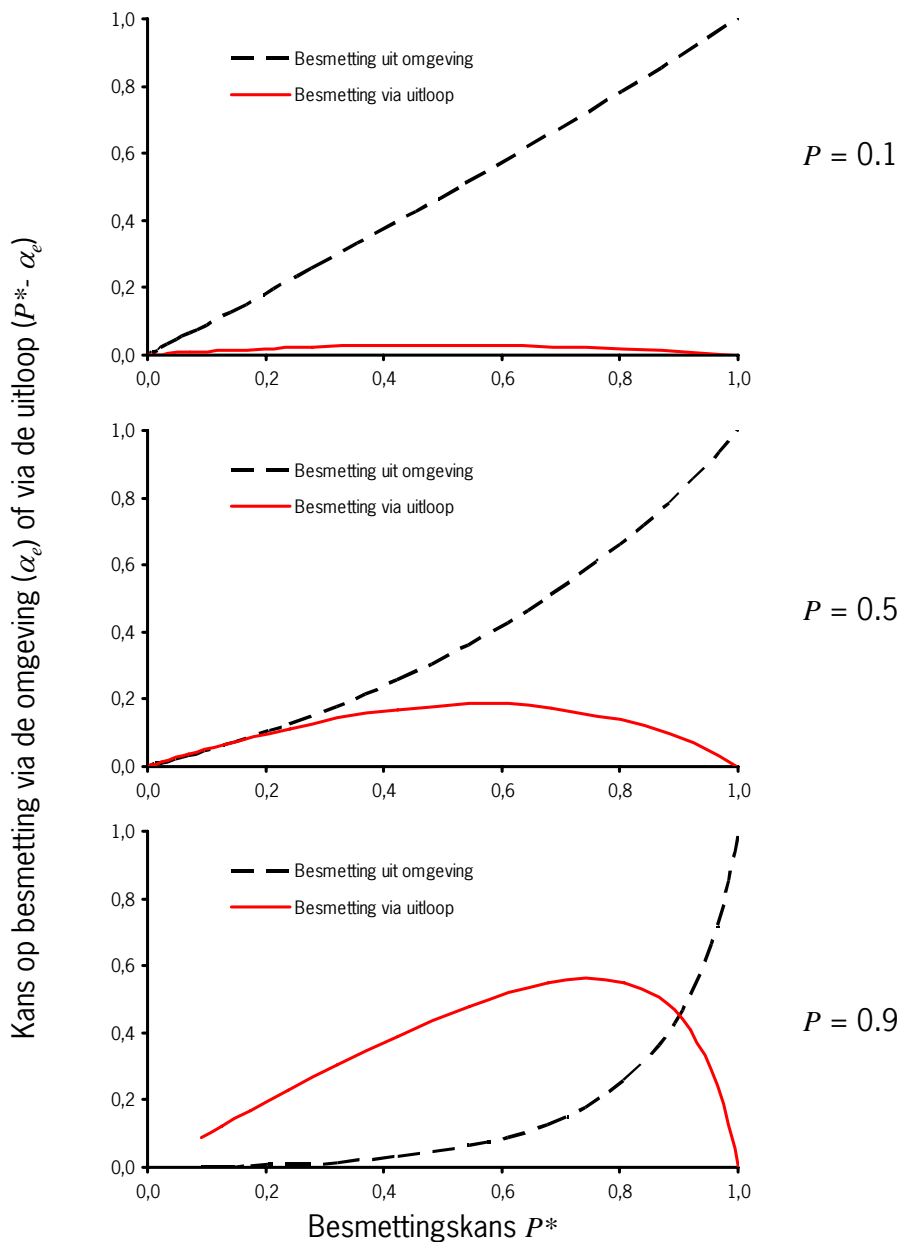
De mestmonsters uit de uitlopen op dag 20 en 24 waren voor een groot deel Salmonella positief (zie tabel 3.7). De blinde darmmonsters die op dag 35 werden onderzocht wezen uit dat in subafdeling 1.1 t/m 1.4 en 2.4 veel meer Salmonellapositieve kuikens aanwezig waren dan in 2.1 t/m 2.3.

De vergelijking tussen de analyses van de mestmonsters en de analyse van blindedarmmonsters laten duidelijk zien hoe veel beperkter de sensitiviteit van de mestmonstername is. Op basis van de blindedarmmonsters zijn vrijwel alle afdelingen positief bevonden, terwijl de mestmonsters in slechts enkele gevallen een positieve uitslag gaven, waarbij op verschillende momenten steeds andere afdelingen positief en dan weer negatief kunnen zijn. Op basis van vergelijking met de resultaten uit serie 3 vinden we geen aanwijzing dat de transmissie tussen rondes via de uitloop bij gelijkblijvende kuikendichtheid afhangt van de populatiegrootte.

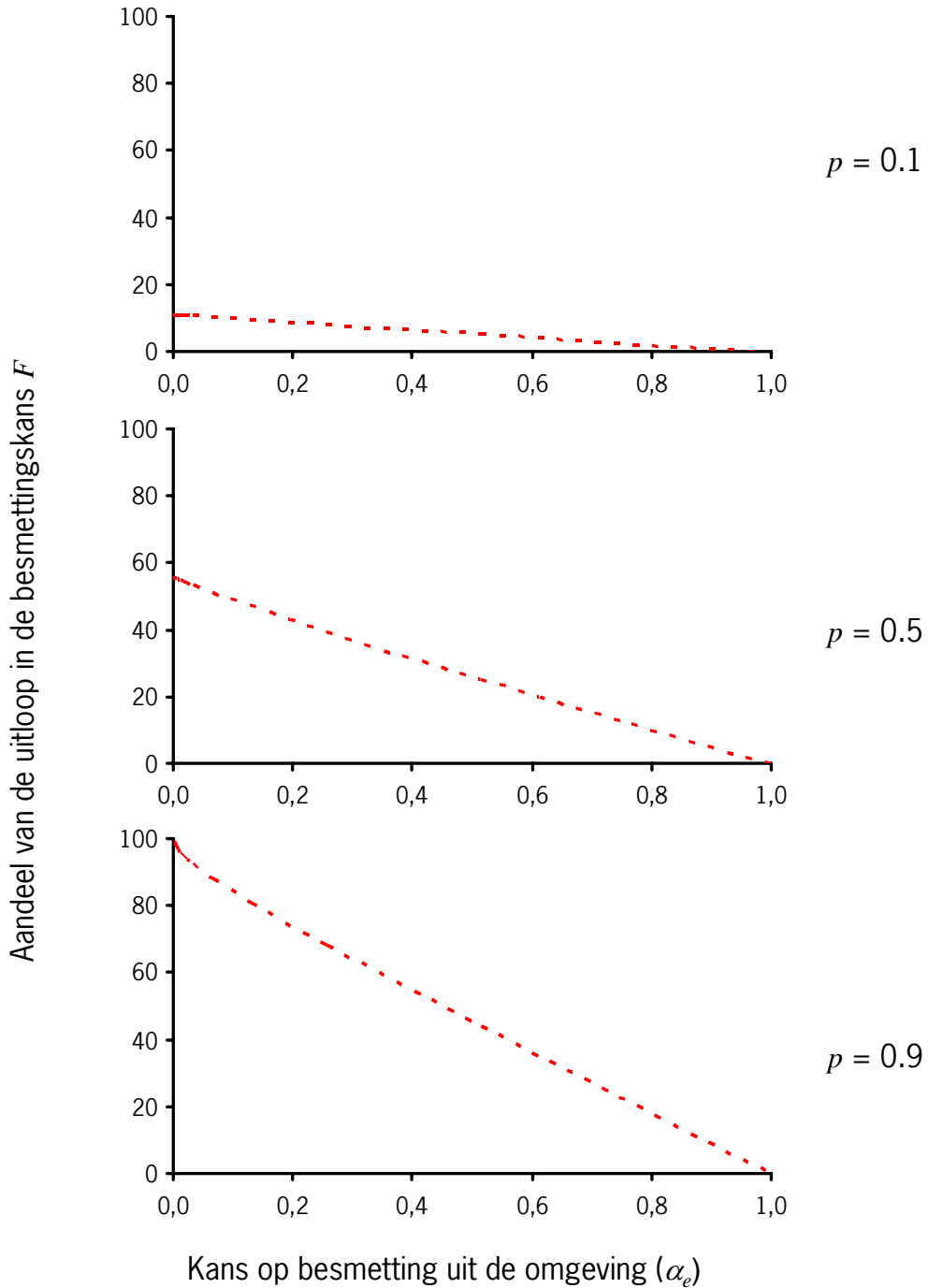
3.2 Modelberekeningen

Met behulp van de wiskundige invulling van de conceptuele beschrijving uit de Inleiding verkennen we nu hoe het aandeel van de uitloop in de kans dat een willekeurige ronde besmet raakt met de kiem (F) afhangt van de besmettingskans van buitenaf (α_e), van de transmissiekans van ronde op ronde (p), en van de vervalfactor van de kiem (γ) in de uitloop. In de Figuren 7, 8 en 9 geven we een overzicht van de modelresultaten voor deze afhankelijkheden.

Figuur 7. Bijdragen van de omgeving (α_e) en de uitloop ($P^* - \alpha_e$) aan de besmettingskans als functie van deze besmettingskans P^* , bij verschillende transmissiekansen p van 0.1 (boven), 0.5 (midden) en 0.9 (beneden) en bij een vervalfactor (γ) van 0.1.

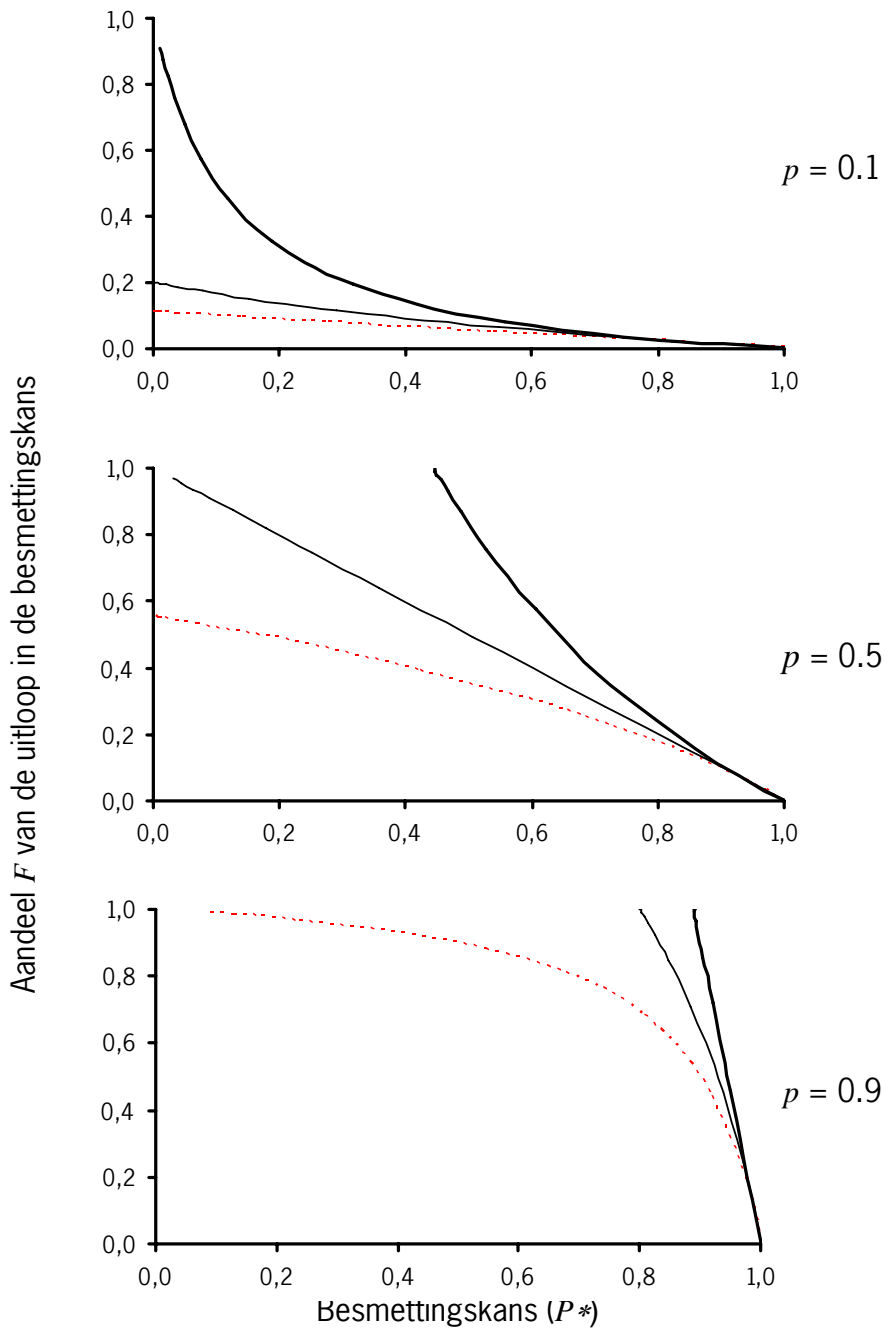


Figuur 8. Relatieve aandeel van de uitloop in de totale besmettingskans afhankelijk van de kans op besmetting uit de omgeving (α_e), bij verschillende transmissiekansen p van 0.1 (boven), 0.5 (midden) en 0.9 (beneden) en bij een vervalfactor (γ) van 0.1.



In figuren 7 en 8 zien we hoe het aandeel van de uitloop in de besmettingskans van een ronde vleeskuikens toeneemt met toenemende vervaltijd en met toenemende transmissiekans en afneemt met toenemende besmettingskans vanuit de omgeving. De afhankelijkheid van de vervalfactor kan als volgt worden begrepen: hoe langzamer het verval van de kiem in het uitloopreservoir, hoe belangrijker de transmissie via het uitloopreservoir tussen niet direct opeenvolgende rondes zal zijn.

Figuur 9. Aandeel van de uitloop (F) in de totale besmettingskans (P^*) van ronde op ronde bij verschillende transmissiekansen p van 0.1 (boven), 0.5 (midden) en 0.9 (beneden) bij verschillende vervalfactoren (..... $\gamma = 0.1$; _____ $\gamma = 0.5$ en _____ $\gamma = 0.9$).



3.3 Statistische analyse van de experimentele observaties

Ronde 1.1 en 1.2 kunnen voor de analyse buiten beschouwing worden gelaten, omdat bleek dat het kunstmatig besmetten van de uitloop in combinatie met het geringe gebruik van de uitloop niet leidde enige mate van besmetting van de binnenstal. Rondes 2.1 en 2.2 zijn wat dat betreft wel representatief; voor Salmonella vinden we alle acht subafdelingen positief op enig tijdstip in ronde 2.2. De puntschatting voor de kans op transmissie tussen opeenvolgende rondes is dus 1. Als we de acht subafdelingen als onafhankelijk beschouwen, vinden we een 95% betrouwbaarheidsondergrens van 0.69 voor deze transmissiekans. Doordat de subafdelingen niet volledig van elkaar afgesloten zijn, is wellicht slechts sprake van twee onafhankelijke eenheden (twee afdelingen). Dit geeft een ondergrens van 0.22 voor de kans op transmissie van ronde op ronde (Tabel 3.8).

Tabel 3.8. De 95% betrouwbaarheidsondergrens (rechtsboven) en -bovengrens (linksonder) voor de transmissiekans van ronde op ronde

| | | # als onafhankelijk beschouwde eenheden | | | | | | | | |
|---|---|---|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| # subafdelingen zonder transmissie van ronde op ronde | 0 | * | 0,05 | 0,22 | 0,37 | 0,47 | 0,55 | 0,61 | 0,65 | 0,69 |
| | 1 | 0,95 | * | 0,05 | 0,22 | 0,37 | 0,47 | 0,55 | 0,61 | 0,65 |
| | 2 | 0,78 | 0,95 | * | 0,05 | 0,22 | 0,37 | 0,47 | 0,55 | 0,61 |
| | 3 | 0,63 | 0,78 | 0,95 | * | 0,05 | 0,22 | 0,37 | 0,47 | 0,55 |
| | 4 | 0,53 | 0,63 | 0,78 | 0,95 | * | 0,05 | 0,22 | 0,37 | 0,47 |
| | 5 | 0,45 | 0,53 | 0,63 | 0,78 | 0,95 | * | 0,05 | 0,22 | 0,37 |
| | 6 | 0,39 | 0,45 | 0,53 | 0,63 | 0,78 | 0,95 | * | 0,05 | 0,22 |
| | 7 | 0,35 | 0,39 | 0,45 | 0,53 | 0,63 | 0,78 | 0,95 | * | 0,05 |
| | 8 | 0,31 | 0,35 | 0,39 | 0,45 | 0,53 | 0,63 | 0,78 | 0,95 | * |

Voor Campylobacter vinden we in ronde 2.2 alle acht subafdelingen negatief op alle tijdstippen van bemonstering, en tevens is in alle acht uitlopen een verzamelmonster uit de uitloop, genomen onmiddellijk (1 dag) voorafgaand aan het naar buiten gaan van de dieren, negatief. Als we zouden aannemen dat de gecombineerde monsternamen samen een sensitiviteit van 100% hebben, betekent dat een bovengrens voor de transmissiekans van ronde op ronde van 0.31, zie Tabel 3.7.

Serie 3 (Salmonella en kleinere populatiegrootte)

We vinden net als in ronde 2.2 weer alle (vijf) subafdelingen positief in ronde 3.2. In ronde 3.3 vinden we deze vijf subafdelingen weer alle positief. Als we, nu voor elk paar opeenvolgende rondes, de gegevens weer als twee onafhankelijke herhalingen beschouwen (twee gescheiden afdelingen met daarin niet van elkaar afgesloten subafdelingen), hebben we in totaal vier herhalingen. Daaruit volgt een 95% betrouwbaarheidsondergrens van 0.47 voor de kans op transmissie van ronde op ronde (Tabel 3.8).

Uitgaande van populatiegrootte-onafhankelijkheid van de transmissiekans tussen rondes, kunnen we de herhalingen voor Salmonella uit series 2 en 3 combineren tot een totaal van zes onafhankelijke herhalingen. Daaruit volgt een 95% betrouwbaarheidsondergrens van 0.61 voor de kans op transmissie van ronde op ronde, zie Tabel 3.8.

De analyses van de blinde darm geven inzicht in de inwendige besmettingsgraad van de vleeskuikens voorafgaand aan de slacht. De gemiddelde besmettingsgraad in de vijf volgens het proefplan behandelde subafdelingen bedraagt 49.0% in de ronde 2.2 en 27.6% in de ronde 2.3. De variatie tussen subafdelingen is groot: de standaardafwijking van het gemiddelde bedraagt $\sigma=11.8\%$ in de tweede ronde en $\sigma=31.1\%$ in de derde. Om na te gaan of het verschil in de gemiddelde besmettingsgraad tussen de ronde 3.2 en 3.3 statistisch significant is of niet, moet dit verschil worden beschouwd in het licht van de verwachte variatie besproken in de conceptuele beschrijving in paragraaf 2.3.

Op basis daarvan toetsen we het verschil tussen rondes op vijf verschillende manieren:

- Non-parametrisch m.b.v. Wilcoxon's signed rank toets (Conover, 1980), tweezijdig. Het resultaat is $P=0.31$, dus geen significant verschil.
- Parametrisch op basis van een geometrische verdeling, exclusief effecten van subafdeling. We vinden $P=0.38$, dus geen significant verschil.
- Parametrisch op basis van een geometrische verdeling, inclusief effecten van subafdeling. Nu is $P=0.88$ voor het verschil tussen rondes, dus opnieuw geen significant verschil.
- Parametrisch volgens een overgedispergeerde binomiale verdeling, exclusief effecten van subafdeling. De variantie = $\phi \cdot n \cdot p \cdot (1-p)$, waarbij de dispersieparameter ϕ wordt geschat uit Pearson's Chi-kwadraat grootte. Hier vinden we $P=0.26$, dus geen significant verschil.
- Parametrisch volgens een overgedispergeerde binomiale verdeling, inclusief effecten van subafdeling. Nu is $P=0.68$ voor het verschil tussen rondes, dus opnieuw geen significant verschil.

De P-waarden voor de parametrische analyses zijn afkomstig van de (quasi) likelihood ratio toets (McCullagh & Nelder, 1989). De resultaten verkregen met de Wald toets zijn vrijwel dezelfde.

Omdat de kuikens in drie afdelingen in ronde 3.2 geruimd werden voordat de toegang tot uitloop openging, verschaffen de analyses van deze afdelingen in de derde ronde enige informatie over de mate waarin de besmettingsgraad van het uitloopreservoir eventueel is afgenomen nadat in de ronde 3.2 geen nieuwe kiemen in dit reservoir zijn terechtgekomen. De gemiddelde besmettingsgraad in deze drie subafdelingen bedraagt 59.0% in ronde 2.3 en de standaardafwijking van het gemiddelde is $\sigma=25.7\%$. Om na te gaan of het verschil in de gemiddelde besmettingsgraad tussen deze drie subafdelingen en de vijf andere (met een gemiddelde besmettingsgraad van 27.6%, zie boven) statistisch significant is of niet, moet dit verschil ook worden beschouwd in het licht van de verwachte variatie besproken in de conceptuele beschrijving in paragraaf 2.3.

Op basis daarvan toetsen we (met de likelihood ratio toets, de Wald toets geeft vergelijkbare resultaten) op twee verschillende manieren:

- Non-parametrisch m.b.v Mann-Witney's toets (Conover, 1980). Het resultaat is $P=0.39$, dus geen significant verschil.
- Parametrisch op basis van een geometrische verdeling. Hier is het resultaat $P=0.28$.

Het verschil tussen de gemiddelde besmettingsgraad in ronde 3.3 in de drie in ronde 3.2 voortijdig geruimde subafdelingen en die in de vijf andere, niet voortijdig geruimde subafdelingen is niet significant. Dit resultaat is consistent met een lange overlevingsduur van Salmonella in mest.

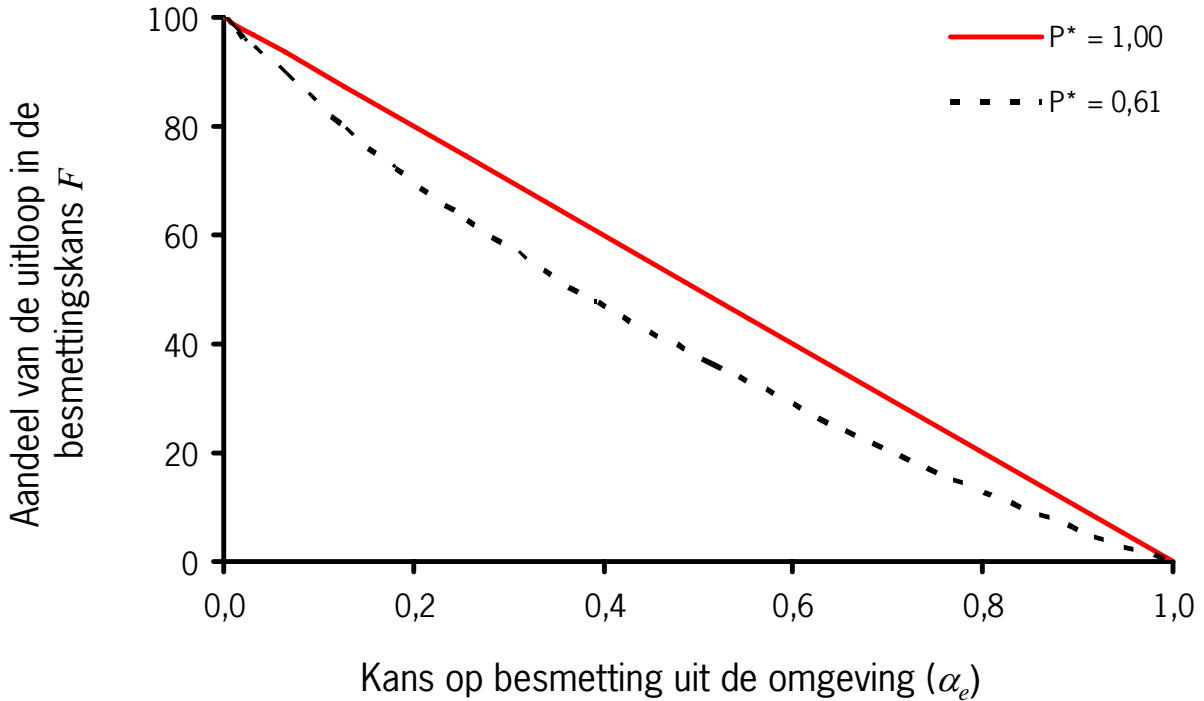
3.4 Het aandeel van de uitloop in de totale transmissiekans

Met behulp van de wiskundige invulling van de conceptuele beschrijving uit de Inleiding verkennen we nu hoe het aandeel van de uitloop in de kans dat een willekeurige ronde besmet raakt met de kiem (F) afhangt van de besmettingskans van buitenaf (α_d), van de transmissiekans van ronde op ronde (p), en van de vervalfactor van de kiem (γ) in de uitloop.

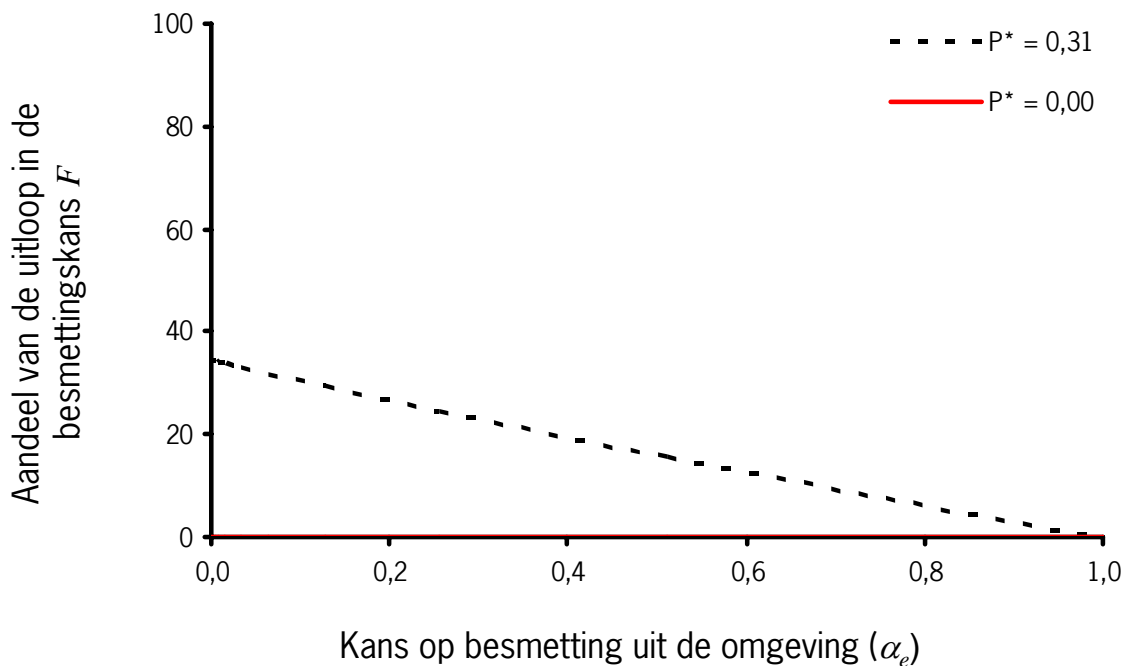
In Figuur 10 kiezen we voor de transmissiekans de waarden $p=1$ (de puntschatting uit deze studie voor Salmonella) en $p=0.61$ (de 95%-betrouwbaarheids ondergrens). De resultaten van de experimenten met Salmonella bevestigen tevens de ervaring dat deze bacterie relatief goed overleeft in zelfs een droge omgeving (langzaam verval). Daarom is de in Figuur 3.4 gekozen waarde "vervalfactor=0.9" indicatief voor Salmonella.

In Figuur 11 kiezen we voor de transmissiekans de waarden $p=0$ (de puntschatting uit deze studie voor Campylobacter) en $p=0.31$ (de 95%-betrouwbaarheids bovengrens). De resultaten van de experimenten laten zien dat Campylobacter slecht overleeft tussen rondes vleeskuikens in een droge uitloopomgeving (snel verval). Daarom is de in Figuur 3.5 gekozen waarde "vervalfactor=0.1" indicatief voor Campylobacter.

Figuur 10. Het relatieve aandeel van de uitloop in de besmettingskans van een willekeurige ronde (F) in afhankelijkheid van de besmettingskans van buitenaf (α_e), voor waarden indicatief voor Salmonella van de transmissiekans van ronde op ronde (puntschatting $p=1.0$ en ondergrens $p=0.61$), en van de vervalfactor van de bacterie (gegeven door $\gamma=0.9$) in de uitloop.



Figuur 11. Het relatieve aandeel van de uitloop in de besmettingskans van een willekeurige ronde (F) in afhankelijkheid van de besmettingskans van buitenaf (α_e), voor waarden indicatief voor Campylobacter van de transmissiekans van ronde op ronde (puntschatting $p=0$ en bovengrens $p=0.31$) en van de vervalfactor van de bacterie (gegeven door $\gamma=0.10$).



De afhankelijkheid van de kans op besmetting vanuit de omgeving kan als volgt worden begrepen: hoe vaker de infectie wordt hergeïntroduceerd vanuit de omgeving, hoe minder belangrijk de bijdrage van de transmissie van ronde op ronde via de uitloop is voor de totale besmettingskans. Uit Figuur 10 en 11 concluderen we dat het aandeel van de uitloop in de kans op besmetting van een ronde afneemt met toenemende kans op besmetting uit de omgeving. Voor grote transmissiekans tussen rondes is de grootte van dit aandeel slechts zwak gevoelig voor de waarde van de vervalfactor.

Voor *Campylobacter*, als gevolg van de veel geringere overleving onder droge omstandigheden, is het aandeel van de uitloop in de kans op besmetting van een ronde veel geringer dan voor *Salmonella*. Voor *Salmonella* is het aandeel van de uitloop in de kans op besmetting van een ronde substantieel. Het is daarom de moeite waard om te zoeken naar maatregelen die de overleving van *Salmonella* tussen rondes kunnen verminderen.

3.5 Interventiestrategie getest

Hier boven concludeerden we dat voor *Salmonella* het aandeel van de uitloop in de kans op besmetting van een ronde zodanig belangrijk is dat het de moeite waard lijkt om te zoeken naar maatregelen om de overleving van *Salmonella* tussen rondes te verminderen. Daarom is op kleine schaal een test uitgevoerd waarbij besmette mest is afgedekt met plastic zeilen om de kiemdruk te verminderen.

Na afloop van een infectie experiment met *Salmonella java* en *Salmonella typhimurium* bij vleeskuikens werd de besmette mest bewaard en gebruikt voor een kiemreductie proef. Ruimtetemperatuur was constant 18°C. De mest werd verdeeld over 7 vlakken van 1m² en 10 cm dik. Vlakken 1 en 2 werden extra besmet met *Salmonella typhimurium*, vlakken 3 en 4 met *Salmonella java*. Vlakken 5, 6 en 7 hadden een natuurlijke besmetting met een combinatie van beide *Salmonella*'s. Van ieder van deze 3 groepen werd 1 vlak afgedicht met een laag plastic, waarna in een periode van 4 weken monsters zijn genomen om het aantal kiemen in een gram mest te bepalen. De resultaten staan weergegeven in tabel 3.9.

Tabel 3.9. Kiemtellingen in verschillende hopen mest verspreid over 7 vlakken, die wel of niet werden afgedekt met plastic.

| vlak | Salmonella besmetting | afdekking | na 1 week | na 2 weken | na 3 weken |
|------|-------------------------|-----------|-----------|------------|------------|
| 1 | + <i>S. typhimurium</i> | ja | 400 | <10 | 0 |
| 2 | + <i>S. typhimurium</i> | nee | 1.400 | 100 | 1.000 |
| 3 | + <i>S. java</i> | ja | 1.500 | <10 | 0 |
| 4 | + <i>S. java</i> | nee | 2.000 | 100 | 1.000 |
| 5 | natuurlijk besmet | nee | 1.000 | 100 | 1.000 |
| 6 | natuurlijk besmet | nee | 100 | 1.000 | 1.000 |
| 7 | natuurlijk besmet | ja | 100 | <10 | 0 |

In de vlakken die waren afgedekt met een plastic zeil was na twee weken het aantal kiemen gereduceerd tot minder dan 10 per gram mest. Na drie weken konden in deze groepen geen kiemen meer worden aangetoond, terwijl in de niet afgedekte groepen het aantal kiemen gelijk was gebleven of was toegenomen tot boven de oorspronkelijke waarden.

4 Conclusies

In dit onderzoek zijn in drie series van respectievelijk 2, 2 en 3 rondes transmissie experimenten uitgevoerd waarbij is bepaald in welke mate de uitloop bijdraagt transmissie en handhaving van zoönosen van ronde op ronde. Het onderzoek richtte zich op de transmissie van Salmonella en Campylobacter van ronde op ronde. Daarbij is een conceptuele beschrijving ontwikkeld met daarin de factoren als populatie, omgeving, uitloop en besmettingsreservoir. Deze beschrijving is daarna vertaald in een wiskundig model waarin termen zijn opgenomen als besmettingsgraad (B), vervalfactor (γ), transmissiekans (p). Naast de uitloop (F) heeft ook de omgeving (α_e) een aandeel in de transmissiekans.

De vergelijking tussen de analyses van de mestmonsters en de analyse van blindedarmmonsters laten duidelijk zien hoe veel beperkter de sensitiviteit van de mestmonstername is. Op basis van de blindedarmmonsters zijn vrijwel alle afdelingen positief bevonden, terwijl de mestmonsters in slechts enkele gevallen een positieve uitslag gaven, waarbij op verschillende momenten steeds andere afdelingen positief en dan weer negatief kunnen zijn. Er werden geen aanwijzingen gevonden dat de transmissie tussen rondes via de uitloop bij gelijkblijvende kuikendichtheid afhangt van de populatiegrootte. Hierdoor konden de herhalingen voor Salmonella uit series 2 en 3 worden gecombineerd tot een totaal van zes onafhankelijke herhalingen. Voor Salmonella is de puntschatting $p=1.00$ en de bijbehorende 95%-betrouwbaarheids ondergrens van de transmissiekans $p=0.61$. De resultaten van de experimenten met Salmonella bevestigen tevens de ervaring dat deze bacterie relatief goed overleeft in zelfs een droge omgeving. Een vervalfactor $\gamma=0.9$ is indicatief voor Salmonella. Voor Campylobacter is de puntschatting $p=0.00$ en de bijbehorende 95%-betrouwbaarheids ondergrens van de transmissiekans $p=0.31$. Campylobacter overleeft slecht tussen rondes vleeskuikens in een droge uitloopomgeving (snel verval). Een vervalfactor $\gamma=0.1$ is indicatief voor Campylobacter.

Het aandeel van de uitloop in de kans op besmetting van een ronde neemt af met toenemende kans op besmetting uit de omgeving. De vervalfactor is weinig gevoelig voor het relatieve aandeel van de uitloop in de totale besmettingskans wanneer de overleving van zoönosen hoog is zoals in het geval van Salmonella. Campylobacter heeft een veel geringere overleving onder droge omstandigheden. Het aandeel van de uitloop in de kans op besmetting van een ronde is hierdoor veel geringer. Omdat voor Salmonella het aandeel van de uitloop in de kans op besmetting van een ronde zeer substantieel is, is het de moeite waard om te zoeken naar maatregelen om de overleving van Salmonella tussen rondes te verminderen.

Voor de handhaving van een besmetting kan onderscheid gemaakt worden tussen transmissie door herhaalde insleep van infectie uit een besmette uitloop (geen terugkoppeling) en transmissie tussen dieren onderling (positieve terugkoppeling). Een positieve terugkoppeling zou de infectiedruk voor (nog) niet geïnfecteerde dieren vergroten, maar deze positieve terugkoppeling kon niet statistisch worden aangetoond. Ook in besmette mest bleef de besmettingsdruk wekenlang hoog, en kon er geen afname van de besmettingsdruk worden aangetoond. Een interventietechniek door middel van het afdekken van de mest met plastic zeilen gedurende 3 weken gaf wel een complete kiemreductie.

De resultaten van dit onderzoek geven aan dat de uitloop een substantiële bijdrage levert aan de handhaving van een Salmonellabesmetting. De conceptuele beschrijving en de wiskundige berekening laten zien dat Salmonella een lage vervalfactor kent, dat wil zeggen dat Salmonella goed overleefd in het strooisel. De kans is minstens 61% dat een volgende ronde kuikens deze besmetting opneemt. Campylobacter kent een lagere vervalfactor, en voor Campylobacter is de transmissiekans van ronde op ronde niet groter dan 31%. Meer onderzoek naar de grootte van de vervalfactor en interventiestrategieën om de transmissiekans tussen rondes te verkleinen dragen bij om gericht het aandeel van de uitloop in de besmettingskans van ronde op ronde te kwantificeren en te verkleinen.

Literatuur

Productschap voor Vee, Vlees en Eieren, Zoetermeer (1999). Branche methoden voor aantonen van Salmonella en Campylobacter. Actieplan Salmonella en Campylobacter in de pluimveevleessector 2000+.

Conover, W.J. (1980). Practical nonparametric statistics. 2nd. ed. Wiley, New York.

McCullagh, P., Nelder, J.A. (1989). Generalized linear models. 2nd. ed. Chapman and Hall, London.

Renshaw, E. (1991). Modelling biological populations in space and time. Cambridge University Press, Cambridge.

Bijlage

We beschrijven de besmettingsstatus (wel of niet besmet) van ronde n , op de laatste dag voor de slacht, met de variabele R_n :

$R_n=0$ (geen uitbraak opgetreden) of $R_n=1$ (wel een uitbraak opgetreden).

We definiëren P_n als de kans dat ronde n een besmetting oploopt vanuit ofwel de uitloop ofwel de omgeving. Samen met de definities en gemaakte modelaannames uit de Inleiding geeft dit de volgende set van vergelijkingen:

$$\begin{aligned} P_n &= \alpha_e + (1 - \alpha_e)P_n = \alpha_e + (1 - \alpha_e)pB_n, \\ B_{n+1} &= R_n + (1 - R_n)\gamma B_n. \end{aligned} \quad (2)$$

Het doel is om de verwachte fractie van door besmetting getroffen rondes te berekenen, hetgeen identiek is aan de verwachte kans op besmetting P^* van een willekeurige ronde n . P^* kan worden berekend door de volgende vergelijkingen op te lossen:

$$\begin{aligned} P^* &= \alpha_e + (1 - \alpha_e)pB^*, \\ B^* &= P^* + (1 - P^*)\gamma B^*. \end{aligned} \quad (3)$$

Hierin is B de verwachte besmettingsgraad van het uitloopreservoir in een willekeurige ronde. Als we B^* hieruit elimineren vinden we de volgende vierkantsvergelijking voor P^* :

$$\gamma(P^*)^2 + (1 - (\gamma + p) - \alpha_e(\gamma - p))P^* - \alpha_e(1 - \gamma) = 0$$

Van de twee oplossingen (een negatieve en een positieve oplossing) is uiteraard alleen de positieve oplossing relevant:

$$P^* = \frac{(\gamma + p) + \alpha_e(\gamma - p) - 1 + \sqrt{(1 - (\gamma + p) - \alpha_e(\gamma - p))^2 + 4\alpha_e\gamma(1 - \gamma)}}{2\gamma} \quad (4)$$

Hierbij hebben we aangenomen dat niet in iedere ronde besmetting vanuit de omgeving optreedt, m.a.w. $\alpha_e < 1$. Vergelijking (4) beschrijft hoe P^* afhangt van de modelparameters α_e , p en γ . Door de rechterkant van deze vergelijking in te vullen voor P^* in vergelijking (1), vinden we ook hoe F afhangt van de modelparameters α_e , p en γ .